



**Titre:** Caractérisation et modélisation de la croissance d'une suspension  
Title: de cellules végétales

**Auteur:** Philippe Lessard  
Author:

**Date:** 2006

**Type:** Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis

**Référence:** Lessard, P. (2006). Caractérisation et modélisation de la croissance d'une  
Citation: suspension de cellules végétales [Mémoire de maîtrise, École Polytechnique de  
Montréal]. PolyPublie. <https://publications.polymtl.ca/7721/>

 **Document en libre accès dans PolyPublie**  
Open Access document in PolyPublie

**URL de PolyPublie:** <https://publications.polymtl.ca/7721/>  
PolyPublie URL:

**Directeurs de  
recherche:**  
Advisors:

**Programme:** Non spécifié  
Program:

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

CARACTÉRISATION ET MODÉLISATION DE LA CROISSANCE D'UNE  
SUSPENSION DE CELLULES VÉGÉTALES

PHILIPPE LESSARD

DÉPARTEMENT DE GÉNIE CHIMIQUE  
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

MÉMOIRE PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION  
DU DIPLOME DE MAÎTRISE ÈS SCIENCES APPLIQUÉES  
(GÉNIE CHIMIQUE)

AVRIL 2006



Library and  
Archives Canada

Bibliothèque et  
Archives Canada

Published Heritage  
Branch

Direction du  
Patrimoine de l'édition

395 Wellington Street  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

395, rue Wellington  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

*Your file    Votre référence*

*ISBN: 978-0-494-17952-9*

*Our file    Notre référence*

*ISBN: 978-0-494-17952-9*

#### NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

#### AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

---

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.

  
**Canada**

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Ce mémoire intitulé:

CARACTÉRISATION ET MODÉLISATION DE LA CROISSANCE D'UNE  
SUSPENSION DE CELLULES VÉGÉTALES

présenté par: LESSARD Philippe

en vue de l'obtention du diplôme de: Maîtrise ès sciences appliquées

a été dûment accepté par le jury d'examen constitué de:

M. KLVANA Danilo, Ph.D., président

M. PERRIER Michel, Ph.D., membre et directeur de recherche

M. SIROIS Joël, Ph.D., membre et codirecteur de recherche

M. JOLICOEUR Mario, Ph.D., membre

**à Gaston.**

*Les plantes par exemple,  
qui n'ont pas de mains et pas d'oreilles,  
elles sentent les choses, les vibrations.*

J.C. VanDamme

## ***Remerciements***

Je tiens à remercier tout particulièrement Sébastien Sarrailh et Sarah Galipeau qui ont si généreusement offert leur aide lors de la plupart des expérimentations réalisées dans ce mémoire et également pour d'autres projets connexes (notamment le dégazage). Vous avez rendu les nombreuses heures sous les néons et dans nos luxueuses installations mobiles des plus agréables. J'ai également eu le privilège de faire partie de l'équipe de travail qui était assurément la plus dynamique, enrichissante et conviviale de toute l'histoire de la biotechnologie. Mathieu, David, Steve, Martin, Martin, Annie, Dominic, Stéphane et Dany, je vous offre mes remerciements les plus sincères.

Je souligne également la contribution de Stéphane, Francis, Serge, Benoit, Julie et Julie-Andrée pour l'analyse méticuleuse de centaines d'échantillons. Votre professionnalisme et votre expertise a fourni l'information vitale qui figure dans ce document. Merci à M. Jean Archambault de m'avoir offert l'opportunité d'effectuer une maîtrise en entreprise.

Je suis également reconnaissant pour les prouesses bureaucratiques de Chantal Bénard. Merci à mon directeur, M. Michel Perrier, pour la compréhension et la confiance qu'il m'a accordé pendant ce long périple. Le support intellectuel, moral et la confiance de mon codirecteur, M. Joël Sirois, même dans les moments les plus difficiles, furent essentiels à la réalisation de ce projet. Sa passion et son professionnalisme furent souvent une inspiration.

Je tiens à rendre hommage à ma famille sans qui rien de tout cela n'aurait été possible. Merci Francine, tu peux prendre ta retraite maintenant.

## Résumé

La pervenche du Madagascar (*Catharanthus roseus*) est la principale source de deux médicaments utilisés en chimiothérapie, la vinblastine et la vincristine. Ces molécules sont utilisées notamment pour le traitement du cancer du poumon et de la leucémie. Cependant, les concentrations naturelles dans la plante sont infimes, la croissance est relativement lente et l'accumulation dans les tissus végétaux dépend grandement des conditions géographiques et environnementales. Ainsi, l'extraction des médicaments à partir de plantes entières est coûteuse et ardue. Afin d'éviter ces problèmes et d'établir une source plus fiable et économique, la culture de cellules en milieu contrôlé est envisagée comme alternative à l'agriculture traditionnelle.

La croissance de cellules végétales *in vitro* dépend d'une multitude de facteurs environnementaux. Une production à grande échelle de molécules produites par des suspensions de cellules végétales nécessite de bien connaître l'impact de ces facteurs afin de pouvoir les contrôler. L'optimisation des conditions expérimentales permet de maximiser la croissance des cellules et de manipuler leur état physiologique. Un outil permettant d'augmenter la compréhension de la dynamique des variables affectant la croissance des cellules végétales est la modélisation mathématique. L'objectif de ce projet est de développer un modèle qui prédit la croissance d'une suspension cellulaire de *C. roseus*. Ce mémoire présente la méthode et les résultats des expérimentations effectuées afin d'atteindre cet objectif.

La méthodologie se divise en deux grandes étapes. D'abord, une caractérisation de la phase de croissance est effectuée, l'effet des principaux nutriments est investigué. L'impact de la concentration d'oxygène dissous est d'abord vérifié en bioréacteurs de 4L. Bien que cette variable n'est pas considérée par le modèle, les observations servent à établir un point de consigne pour les expériences subséquentes. Cinq concentrations d'oxygène dissous sont testées soit 1.5%, 30%, 60%, 120% et 180%. Les taux de

croissance observées sont comparables pour toutes les concentrations mis à part celle à 1.5 % qui est sensiblement plus lente. La consigne est fixée à 120% pour le reste des expériences en bioréacteurs afin d'assurer un contrôle aisé de la concentration et éviter toute limitation de la croissance.

L'effet des macronutriments sur la croissance est d'abord investigué en déterminant les rendements pour les sources de carbone (sucres), d'azote et de phosphate. On vérifie d'abord les rendements en biomasse sèche et en cellules pour trois sucres (sucrose, glucose et fructose). Les rendements obtenus sont identiques pour les trois. La seconde expérience consiste à déterminer les rendements avec une méthode plus rigoureuse. Des flacons de 1L sont inoculés avec une suspension cellulaire préalablement épuisée en carbone (sucres). Des cultures avec 0, 5, 10, 15 et 20 g/L de sucrose sont démarrées en triplicata. Les rendements sont déterminés à partir de la biomasse et des cellules générées dans les cultures. Le rendement moyen des sucres en biomasse sèche est de 0.37 gDW/g et celui en cellules est de  $0.1 \times 10^9$  /g. Les rendements en nitrate et en ammonium sont déterminés par la même méthode avec des concentrations initiales de 0, 2, 5, 10 et 15 mM. Les rendements sont identiques pour les deux ions soit 0.76 gDW/mmol en biomasse sèche et  $0.49 \times 10^9$  /mmol en cellules. Pour le phosphate, les rendements sont de 4.8 gDW/mmol et  $4.2 \times 10^9$  cellules/mmol.

L'autre étape de la caractérisation de la croissance consiste à vérifier si les taux de croissance dépendent de la concentration des sources de carbone, du nitrate, de l'ammonium et de la concentration intracellulaire de phosphate libre. Trois bioréacteurs sont d'abord inoculés et maintenus à des concentrations de glucose différentes (5, 30 et 60g/L). Les taux de croissance moyens sont plus lents pour le bioréacteur avec 5 g/L, suggérant que les taux de croissance de la biomasse sèche et de prolifération cellulaire évoluent selon une cinétique de Michaelis–Menten en fonction de la concentration des sources de carbone. Pour les sources d'azote, la croissance de



cinq cultures en bioréacteur ayant différentes concentrations en nitrate et en ammonium est comparée. Le seul effet décelé sur la croissance est une inhibition des taux de croissance lorsque la concentration d'ammonium est élevée. Aucun effet de la concentration intracellulaire de phosphate libre n'est observé en comparant les taux de croissance de trois bioréacteurs alimentés avec des débits différents de phosphate.

Avec l'information obtenue par la caractérisation de la croissance, le modèle est élaboré. Les bilans de masse sont établis afin d'obtenir un système d'équations différentielles et les cinétiques d'absorption sont définies pour les nutriments extracellulaires étudiés. Le modèle d'absorption des sources de carbone considère que le sucrose n'est pas absorbé par les cellules. Ce dernier est hydrolysé par les acides invertases dans le milieu extracellulaire en une molécule de glucose et une de fructose. Le glucose et le fructose sont absorbés par les cellules à des taux définis par une cinétique d'inhibition compétitive. Le transport du fructose est ralenti par la présence de glucose et vice-versa. Le transport des sources d'azote est modélisé par une équation à double affinité. La composante à basse affinité est une relation linéaire qui varie en fonction de la concentration de l'ion. La haute affinité est modélisée par une fonction échelon. Puisque l'absorption complète du phosphate est généralement plus rapide que l'intervalle d'échantillonnage, un taux constant est fixé de manière à satisfaire les données expérimentales disponibles. Ayant défini toutes les équations du modèle, des simulations numériques sont effectuées afin de déterminer les paramètres manquants. Ceux-ci sont déterminés par minimisation de l'erreur d'estimation de la biomasse sèche et du dénombrement cellulaire sur dix cultures en flacons de 1L. Une étude de sensibilité des paramètres est également réalisée. Le modèle est finalement validé en simulant cinq cultures en cuvée alimentée (bioréacteurs de 4L). L'erreur relative moyenne d'estimation du modèle est de 15% pour la biomasse sèche et de 23% pour le dénombrement cellulaire.

## **Abstract**

Madagascar periwinkle (*catharanthus roseus*) is the main source of two drugs used in chemotherapy, vinblastine and vincristine. These molecules are used as a treatment for some types of cancer including leukaemia, lymphoma, breast and lung cancer. However, concentrations of these active compounds are low, the growth rate of the plants is slow and the accumulation pattern is highly dependant of geographical and environmental conditions. Therefore, it is not an easy task to produce the drugs economically by extracting the whole plants. In an effort to establish a more reliable and cost effective source, *in vitro* culture of plant cell tissues is seen as an attractive alternative.

Plant cell growth is linked to a wide variety of environmental factors. Successful large scale production of useful metabolites implies a good understanding of the impact of these factors in order to provide an ideal environment to the cell suspension. Control over these factors enables the optimization of cell growth while giving a way to steer cell metabolism in the desired way.

Mathematical models are useful in increasing our understanding of complex systems such as plant cell growth. The objective of this project is to develop a model that predicts the growth of a cell suspension of *C. roseus*. This document presents the results of the experiments made to reach this objective.

The methodology is divided in two steps. First the influence of the major nutrients is studied. Dissolved oxygen concentration is tested with bioreactor cultures. Five concentrations are used: 1.5%, 30%, 60%, 120% and 180%. Cell growth was significantly slower at 1.5% while the other cultures showed comparable growth rates. The set point for the remaining cultures in bioreactor in this project is fixed to 120% to

avoid any undesired growth limitation and to provide a smooth control of the dissolved oxygen levels.

Macronutrients yields were determined using 250 mL shake flask cultures. Dry weight and cell yields were both determined for carbon sources (glucose, sucrose and fructose). The yields obtained were identical for all three. These yields were further confirmed with a more precise method. Cells were previously starved in a carbon-free medium. These cells were then distributed in shake flasks containing 0, 5, 10, 15 or 20 g/L of sucrose. The yields were calculated from generated dry weight and cells. The average yields are respectively 0.37 gDW/g and  $0.1 \times 10^9$  cells/g. The same method was used for nitrate, ammonium and phosphate. Both nitrogen ions gave the same yields: 0.76 gDW/mmol and  $0.49 \times 10^9$  cells/g. Phosphate yields are 4.8 gDW/mmol and  $4.2 \times 10^9$  cells/mmol.

The second step of the experiment was to determine whether growth rates depends on nutrients concentration. For carbon sources, three bioreactors were inoculated and maintained at different glucose concentrations (5, 30 and 60 g/L). Growth rates were significantly slower at 5 g/L, suggesting a Michaelis-Menten behaviour. For nitrogen ions, five bioreactors with varying concentrations of nitrate and ammonium were used. The only noticeable effect was observed at high ammonium concentrations, where growth was inhibited. Phosphate kinetics were investigated by feeding three bioreactors with a variable rates of a concentrated phosphate solution and by measuring the free intracellular phosphate. No noticeable change on the growth rates was observed.

With the information obtained from these experiments, The growth model was defined. Mass balance were established and provided a differential equations system. Uptake kinetics for extracellular nutrients were defined and the constants were determined.

Sucrose is completely hydrolysed to glucose and fructose in the culture medium. These two carbohydrates are then transported into the cells following a competitive inhibition kinetic. The glucose uptake rate is inhibited by the presence of fructose and fructose rate is inhibited by the presence of glucose. Nitrogen ions were modeled following a dual affinity transport system model. The low affinity part is linear and depends on the ion concentration in the medium while the high affinity part is constant. Phosphate uptake was usually too fast compared to the sampling interval and was given a constant rate satisfying the available data.

The growth rate parameters that were not determined experimentally were used to minimize the estimation error of the model on the dry weight and the cell count. Ten 1L. shake flasks cultures were used for the minimization. Finally, the model was validated by simulating five fed-batch bioreactor cultures. The average relative error on the dry weight was 15% and 23% on the cell count.

## ***Table des matières***

<b>DÉDICACE.....</b>	<b>IV</b>
<b>REMERCIEMENTS .....</b>	<b>V</b>
<b>RÉSUMÉ.....</b>	<b>VI</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>IX</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES .....</b>	<b>XII</b>
<b>LISTE DES FIGURES.....</b>	<b>XVI</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX .....</b>	<b>XX</b>
<b>LISTE DES ANNEXES .....</b>	<b>XXI</b>
<b>NOMENCLATURE .....</b>	<b>XXII</b>
<b>1 INTRODUCTION .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Problématique.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Objectifs de recherche.....</b>	<b>2</b>
<b>1.3 Méthodologie.....</b>	<b>2</b>
<b>2 REVUE DE LA LITTÉRATURE.....</b>	<b>4</b>
<b>2.1 Croissance des végétaux et cultures <i>in vitro</i> .....</b>	<b>4</b>
2.1.1 Historique de la culture des tissus végétaux.....	5
2.1.2 Suspensions de cellules végétales .....	6
<b>2.2 Nutrition des cellules végétales.....</b>	<b>8</b>
2.2.1 Macronutriments.....	9
2.2.2 Micronutriments .....	11
2.2.3 Phytohormones .....	13

<b>2.3</b>	<b>Transport membranaire .....</b>	<b>15</b>
2.3.1	Transport de l'azote.....	16
2.3.2	Transport des sources de carbone.....	20
2.3.2.1	Hydrolyse du Sucrose.....	22
2.3.2.2	Transport du glucose et du fructose.....	23
2.3.3	Transport du phosphate .....	24
<b>2.4</b>	<b>Modélisation de suspensions de cellules végétales. ....</b>	<b>26</b>
2.4.1	Concepts généraux.....	26
2.4.2	Types de modèles. ....	28
2.4.3	Modèles prédictifs recensés.....	30
<b>3</b>	<b>MATÉRIEL ET MÉTHODES.....</b>	<b>46</b>
<b>3.1</b>	<b>Lignée cellulaire et maintien.....</b>	<b>46</b>
<b>3.2</b>	<b>Milieu de culture.....</b>	<b>47</b>
<b>3.3</b>	<b>Cultures en flacon.....</b>	<b>47</b>
3.3.1	Études et calculs des rendements .....	48
<b>3.4</b>	<b>Cultures en bioréacteur .....</b>	<b>49</b>
3.4.1	Préparation et Inoculation.....	51
3.4.2	Contrôle des gaz dissous .....	51
<b>3.5</b>	<b>Conditions d'opération .....</b>	<b>52</b>
3.5.1	Cultures en cuvée .....	52
3.5.2	Cultures en cuvée alimentée.....	52
<b>3.6</b>	<b>Échantillonnage et suivi .....</b>	<b>53</b>
3.6.1	Biomasse sèche et humide.....	54
3.6.2	Dénombrement cellulaire .....	54
3.6.3	pH .....	56
3.6.4	Concentration des nutriments extracellulaires.....	56

3.6.5	Concentration des nutriments extracellulaires.....	57
<b>3.7</b>	<b>Méthodes analytiques.....</b>	<b>57</b>
3.7.1	Ions .....	57
3.7.2	Glucides.....	58
<b>3.8</b>	<b>Calculs des taux de croissance.....</b>	<b>59</b>
<b>4</b>	<b>CARACTÉRISATION DE LA CROISSANCE DE C. ROSEUS.....</b>	<b>61</b>
<b>4.1</b>	<b>Effet de l'oxygène dissous .....</b>	<b>62</b>
<b>4.2</b>	<b>Effet des sources de carbone.....</b>	<b>65</b>
4.2.1	Croissance selon la source de carbone .....	66
4.2.2	Rendements .....	68
4.2.3	Cinétique de croissance .....	72
<b>4.3</b>	<b>Effet des sources d'azote .....</b>	<b>76</b>
4.3.1	Rendements en Nitrate .....	77
4.3.2	Rendements en Ammonium .....	81
4.3.3	Cinétiques de croissance des ions azotés.....	84
4.3.3.1	Cinétique en fonction de l'ammonium .....	86
4.3.3.2	Cinétique en fonction du nitrate .....	88
4.3.3.3	Surdose d'ammonium.....	91
4.3.3.4	Conclusions des cinétique de croissance des ions azotés.....	94
<b>4.4</b>	<b>Effet du phosphate.....</b>	<b>95</b>
4.4.1	Rendements en phosphate .....	95
4.4.2	Cinétique en fonction du phosphate .....	100
<b>5</b>	<b>MODÉLISATION .....</b>	<b>105</b>
<b>5.1</b>	<b>Schème réactionnel.....</b>	<b>108</b>
<b>5.2</b>	<b>Bilans de matière .....</b>	<b>111</b>
5.2.1	Bilans des nutriments extracellulaires.....	112

5.2.2	Bilans des nutriments intracellulaires.....	113
5.2.3	Bilans de biomasse sèche et dénombrement cellulaire.....	114
<b>5.3</b>	<b>Simulations numériques.....</b>	<b>114</b>
5.3.1	Calculs d'erreur d'estimation du modèle .....	116
5.3.2	Minimisation de l'erreur d'estimation.....	117
<b>5.4</b>	<b>Cinétique d'absorption des sucres .....</b>	<b>118</b>
5.4.1	Hydrolyse du sucrose .....	119
5.4.2	Absorption du glucose et du fructose .....	122
<b>5.5</b>	<b>Cinétiques d'absorption des Composés azotés.....</b>	<b>128</b>
5.5.1	Cinétique d'absorption du NO <sub>3</sub> .....	128
5.5.2	Cinétique d'absorption du NH <sub>4</sub> .....	131
<b>5.6</b>	<b>Cinétique d'absorption du PO<sub>4</sub> .....</b>	<b>133</b>
<b>5.7</b>	<b>Taux de croissance et de prolifération cellulaire.....</b>	<b>135</b>
<b>5.8</b>	<b>Étude de sensibilité des paramètres.....</b>	<b>143</b>
<b>5.9</b>	<b>Validation du modèle .....</b>	<b>146</b>
<b>5.10</b>	<b>Limites du modèle.....</b>	<b>151</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS .....</b>	<b>153</b>
	<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>157</b>
	<b>ANNEXES .....</b>	<b>170</b>



## Liste des figures

Figure 2-1 : Cellules d'une suspension cellulaire de <i>Catharanthus roseus</i> (100X).....	8
Figure 2-2 : Profil de vitesse d'absorption typique d'un nutriment .....	16
Figure 2-3 : Schéma du transport membranaire du nitrate et de l'ammonium.....	19
Figure 2-4 : Schéma du transport du sucrose chez les végétaux .....	21
Figure 2-5 : Activité des invertases en fonction de la concentration en sucrose.....	23
Figure 2-6 : Courbe de croissance typique. ....	27
Figure 2-7 : Caractéristiques des modèles de croissance. ....	29
Figure 2-8 : Schéma du modèle de Takeda et al. (1998).....	37
Figure 2-9 : Cinétiques de croissance de <i>Azadirachta indica</i> .....	43
Figure 3-1 : Bioréacteur de 4L .....	50
Figure 4-1 : Concentration de l'oxygène dissous dans cinq bioréacteurs. ....	63
Figure 4-2 : Effet de l'oxygène dissous sur les taux de croissance .....	64
Figure 4-3 : Croissance et rendements en fonction de la source de carbone.....	67
Figure 4-4 : Suspension privée de sucres. ....	69
Figure 4-5 : Rendements en source de carbone.....	70
Figure 4-6 : Sucres totaux des cultures de rendements en source de carbone.....	71
Figure 4-7 : Concentration en glucose, cinétique de croissance. ....	73
Figure 4-8 : Cinétique de croissance en fonction de la concentration en glucose.....	74
Figure 4-9 : Effet du glucose sur le rapport biomasse humide / biomasse sèche.....	76
Figure 4-10: Suspension privée d'azote. ....	78
Figure 4-11: Rendements en nitrate .....	79
Figure 4-12 : Sources de carbone extracellulaires, rendements en nitrate. ....	80
Figure 4-13 : Rendements en ammonium .....	82
Figure 4-14 : Concentration des ions azotés, cinétique de croissance en ammonium ..	86
Figure 4-15 : Cinétique de croissance en fonction de la concentration en ammonium..	87
Figure 4-16 : Concentration des ions azotés, cinétique de croissance en nitrate .....	89
Figure 4-17 : Cinétique de croissance en fonction de la concentration en nitrate.....	90

Figure 4-18 : Concentration des ions azotés pour la cinétique de croissance avec surdose d'ammonium. ....	91
Figure 4-19 : Cinétique de croissance pour la surdose d'ammonium .....	93
Figure 4-20 : Suspension privée de phosphate. ....	96
Figure 4-21 : Rendements en phosphate .....	97
Figure 4-22 : Sucres totaux des cultures de rendement en phosphate. ....	98
Figure 4-23 : Comparaison biomasse générée et potentiel de croissance en sucres. ....	99
Figure 4-24 : Concentrations de phosphate intracellulaire. ....	102
Figure 4-25 : Profils de croissance en fonction du phosphate. ....	103
Figure 4-26 : Taux de croissance en fonction de la concentration intracellulaire de phosphate libre. ....	104
Figure 5-1 : Retour sur la méthodologie du projet. ....	107
Figure 5-2 : Schème réactionnel du modèle. ....	109
Figure 5-3 : Modèle d'hydrolyse du sucrose superposé à 16 cultures. ....	121
Figure 5-4 : Modèle d'absorption du fructose et du glucose sans inhibition. ....	124
Figure 5-5 : Modèle d'absorption des hexoses avec inhibition. ....	127
Figure 5-6 : Modèle d'absorption du nitrate appliqué à 8 cultures .....	129
Figure 5-7 : Modèle d'absorption de l'ammonium. ....	132
Figure 5-8 : Modèle d'absorption du phosphate. ....	135
Figure 5-9 : Valeur du terme d'inhibition des taux de croissance en fonction de la concentration en ammonium. ....	137
Figure 5-10 : Erreur relative moyenne d'estimation du modèle. ....	139
Figure 5-11 : Modélisation de la biomasse sèche de 10 cultures .....	140
Figure 5-12 : Modélisation du dénombrement cellulaire de 10. ....	140
Figure 5-13 : Variation de l'erreur relative moyenne d'estimation du modèle sur la biomasse sèche. ....	143
Figure 5-14 : Variation de l'erreur relative moyenne d'estimation du modèle sur le dénombrement cellulaire .....	145

Figure 5-15 : Erreur relative moyenne d'estimation du modèle-Validation .....	147
Figure 5-16 : Profils de la biomasse sèche et du dénombrement- Validation .....	148
Figure A-1 : Suivi des sous cultures.....	170
Figure B-1 : Données bruts de la culture à 1.5% OD .....	172
Figure B-2 : Données brutes de la culture à 30% OD .....	173
Figure B-3 : Données bruts de la culture à 60% OD .....	174
Figure B-4 : Données bruts de la culture à 120% OD .....	175
Figure B-5 : Données bruts de la culture à 180% OD .....	176
Figure C-1 : Données bruts de la culture à 5 g/L de glucose .....	177
Figure C-2 : Données bruts de la culture à 30 g/L de glucose .....	178
Figure C-3 : Données bruts de la culture à 60 g/L de glucose .....	179
Figure D-1 : Données bruts de la culture à 22 mM de NO <sub>3</sub> et 4 mM de NH <sub>4</sub> .....	180
Figure D-2 : Données bruts de la culture à 23 mM de NO <sub>3</sub> et 10 mM de NH <sub>4</sub> .....	181
Figure D-3 : Données bruts de la culture à 13 mM de NO <sub>3</sub> et 5 mM de NH <sub>4</sub> .....	182
Figure D-4 : Données bruts de la culture à 13 mM de NO <sub>3</sub> et 8mM de NH <sub>4</sub> .....	183
Figure D-5 : Données bruts de la culture avec surdose de NH <sub>4</sub> .....	184
Figure E-1 : Données bruts de la culture avec 0.07 mmol/ gDW de phosphate intracellulaire.....	185
Figure E-2 : Données bruts de la culture avec 0.08 mmol/ gDW de phosphate intracellulaire.....	186
Figure E-3 : Données bruts de la culture avec 0.12 mmol/ gDW de phosphate intracellulaire.....	187
Figure F-1 : Hiérarchie des routines utilisées lors des simulations numériques .....	188
Figure G-1 : Simulation de la culture C1.....	202
Figure G-2 : Simulation de la culture C2.....	203
Figure G-3 : Simulation de la culture C3.....	204
Figure G-4 : Simulation de la culture C4.....	205
Figure G-5 : Simulation de la culture C5.....	206

Figure G-6: Simulation de la culture C6.....	207
Figure G-7: Simulation de la culture C7.....	208
Figure G-8: Simulation de la culture C8.....	209
Figure G-9: Simulation de la culture C9.....	210
Figure G-10: Simulation de la culture C10.....	211
Figure H-1: Simulation de la culture C1.....	212
Figure H-2: Simulation de la culture C2.....	213
Figure H-3: Simulation de la culture C3.....	214
Figure H-4: Simulation de la culture C4.....	215
Figure H-5: Simulation de la culture C5.....	216

## ***Liste des tableaux***

Tableau 2-1 : Fonctions des micronutriments .....	12
Tableau 2-2 : Fonctions des phytohormones.....	14
Tableau 4-1 : Composition de la solution d'ajout de glucose .....	73
Tableau 4-2 : Composition des solutions d'ajout d'ions azotés .....	84
Tableau 4-3 : Composition de la solutions d'ajout de phosphate.....	101
Tableau 5-1 : Valeur des paramètres de la vitesse d'hydrolyse. ....	120
Tableau 5-2 : Valeur des paramètres de l'absorption du glucose et du fructose.....	125
Tableau 5-3 : Paramètres d'absorption du nitrate.....	130
Tableau 5-4 : Paramètres d'absorption de l'ammonium .....	133
Tableau 5-5 : Paramètres d'absorption du phosphate.....	134
Tableau 5-6 : Paramètres de taux de croissance et de prolifération cellulaire .....	137
Tableau A-1 : Composition du milieu de culture .....	171

**Liste des annexes**

Annexe A: Suivi des sous cultures et composition du milieu de culture.....	170
Annexe B: Données bruts des cultures de l'étude de l'oxygène dissous. ....	172
Annexe C: Données bruts des cultures de la cinétique de croissance en glucose.....	177
Annexe D: Données bruts des cultures des cinétiques de croissance en azote .....	180
Annexe E: Données bruts des cultures des cinétiques de croissance en Phosphate.....	185
Annexe F: Routines Matlab des simulations numériques.....	188
Annexe G: Simulations des cultures utilisées pour la détermination des paramètres...202	
Annexe H: Simulations des cultures utilisées pour la validation du modèle.....	212

## Nomenclature

$a$	Constante de la composante à haute affinité de l'absorption.	L/h/gDW
$C$	Concentration cellulaire	$10^9$ /L ou $10^6$ /mL
$CHO$	Concentration totale des sucres extracellulaires	g/L
$C_{i,f}$	Concentration de $i$ dans le débit d'alimentation	mM ou g/L
$CPE$	Carré pondéré des erreurs	Sans dimension
$D$	Taux de dilution	1/h
$DW$	Biomasse sèche	g/L
$ERM$	Erreur relative moyenne	%
$f$	Taux d'alimentation	mM/h ou g/L/h
$F$	Concentration extracellulaire de fructose	g/L
$\phi$	Taux d'absorption	mM/gDW/h ou g/L/gDW/h
$G$	Concentration de glucose	g/L
$Indice\ i$	Concentration intracellulaire	mmol/ $10^9$ cellules
$K$	Constante	Variable
$\mu_{c,max}$	Taux de prolifération cellulaire maximal	1/h
$\mu_c$	Taux de prolifération cellulaire	1/h
$\mu_x$	Taux de croissance de la biomasse sèche	1/h
$\mu_{x,max}$	Taux de croissance de la biomasse sèche maximal	1/h
$NH_4$	Concentration extracellulaire d'ammonium	mM

$NO_3$	Concentration extracellulaire de nitrate	mM
$N_t$	Concentration totale extracellulaire d'azote ( $NO_3+NH_4$ )	mM
$OD$	Oxygène dissous	%
$P$	Concentration de produits	mM
$PO_4$	Concentration extracellulaire de phosphate	mM
$Q_{éch}$	Débit d'échantillonnage	
$S$	Concentration extracellulaire de sucrose	g/L
$t$	temps	h
$V$	Volume de liquide dans la culture	L
$V_{max}$	Vitesse d'absorption maximale	mmol/gDW/h ou g/gDW/h
$WW$	Biomasse humide	g/L
$X$	Biomasse sèche	g/L
$\xi$	Variable du modèle	g/L ou mM
$Y_{c/i}$	Rendement en cellules de i	mmol/cellule ou g/cellule
$Y_{x/i}$	Rendement en biomasse sèche de i	mmol/gDW ou g/gDW



## **1 Introduction**

Le règne végétal constitue la principale ressource de la majorité de la population mondiale pour le traitement des maladies. Dans les sociétés industrialisées, cette ressource fut délaissée au profit de la synthèse chimique mais la complexité de certaines molécules nécessite toujours l'extraction de plantes entières. La pervenche du Madagascar, *Catharanthus roseus*, est la principale source de vinblastine et de vincristine, deux molécules utilisées pour le traitement du cancer du sein, du poumon, de la leucémie et de la maladie de Hodgkin. Cependant, la production naturelle de ces molécules est infime et des quantités considérables de végétaux doivent être récoltées (20 tonnes pour 1 kilo de vinblastine/vincristine, Misawa, 1994). Dans un effort pour éviter les désavantages relatifs à l'agriculture traditionnelle (sécheresses, maladies, qualité des récoltes), la communauté scientifique envisage la culture de cellules végétales comme alternative à la production de ces médicaments (Verpoorte et al., 2000).

### **1.1 Problématique**

Afin d'assurer un approvisionnement suffisant et de qualité constante, la production de ces phytomolécules doit se faire dans un environnement contrôlé. La culture en bioréacteur de suspensions de cellules végétales offre cette possibilité. Par contre, à ce jour, peu de bioprocédés de production de métabolites secondaires par des suspensions cellulaires sont exploités de façon rentable. La faible productivité en métabolites secondaires des espèces végétales étudiées en est partiellement responsable (Galipeau, 2004).

La phase de production d'une culture de cellules est souvent induite par l'utilisation d'éliciteurs qui forcent le métabolisme cellulaire vers la synthèse des molécules d'intérêts (Sarrailh, 2004). Cette phase de production est toujours précédée par une phase de croissance pendant laquelle les conditions environnementales sont ajustées afin de favoriser la multiplication des cellules. Lorsque la production doit être effectuée à haute densité cellulaire, le temps nécessaire à l'obtention de la biomasse désirée peut être relativement long, devenant ainsi l'étape limitante du bioprocédé. La compréhension et la maîtrise de la phase de croissance est une étape obligatoire à l'établissement d'un bioprocédé industriel économiquement viable.

## **1.2 Objectifs de recherche**

La modélisation mathématique de la phase de croissance est un outil utile afin de mieux comprendre la dynamique complexe qui existe entre les différentes variables qui régissent la division cellulaire. L'objectif du présent projet est d'étudier la phase de croissance d'une suspension cellulaire *C. roseus* et de développer un modèle qui prédit sa croissance. Pour y arriver, une caractérisation de l'impact des variables considérées par le modèle est effectuée et le modèle est développé en considérant les résultats obtenus.

## **1.3 Méthodologie**

La caractérisation de la croissance consiste à quantifier les besoins nutritionnels des cellules en sources de carbone (sucres), d'azote (nitrate et ammonium) et de phosphate. Les rendements en biomasse sèche et en cellules sont d'abord déterminés. Ces expériences sont réalisées en flacons agités de 250 mL afin de permettre la réalisation d'un nombre élevé d'expériences. L'effet de la concentration des nutriments sur les vitesses de croissance de la biomasse sèche et de la prolifération cellulaire est

également observé avec des cultures en bioréacteurs. Ce système permet d'alimenter en continue un nutriment afin de maintenir sa concentration constante.

À l'aide de ces observations, le modèle est développé afin de modéliser l'accroissement de la biomasse sèche et de la concentration cellulaire. La première étape de la modélisation consiste à établir un schème réactionnel (section 5.3) décrivant le modèle. À partir de celui-ci, les bilans de masse sont définis et forment un système d'équations différentielles. La définition mathématique du modèle est complétée en établissant les taux d'absorption des nutriments et les taux de croissance (biomasse sèche et concentration cellulaire).

Les constantes de ces cinétiques sont, dans la mesure du possible, déterminées expérimentalement ou tirées de la littérature. Les paramètres inconnus sont utilisés afin de minimiser l'erreur d'estimation du modèle avec des cultures cuvées en flacons. Le modèle est finalement validé par la simulation de cultures effectuées en bioréacteurs.

## **2 Revue de la littérature**

La revue de la littérature proposée présente des sujets reliés de près ou de loin à la modélisation de la croissance *in vitro* de cellules végétales. Un survol de la croissance des végétaux est effectué en décrivant notamment les concepts de différenciation cellulaire et de totipotence. Ensuite, les facteurs qui affectent la croissance et la division cellulaire sont exposés avec une emphase sur les nutriments. Le transport des macronutriments et les mécanismes biologiques qui le régit sont explorés afin de mieux comprendre les cinétiques d'absorption et d'éventuellement les appliquer au modèle développé. Finalement, une revue de modèles de croissance recensés dans la littérature est offerte.

### **2.1 Croissance des végétaux et cultures *in vitro***

Les plantes sont des organismes multicellulaires composés de tissus remplissant des fonctions biologiques spécifiques. Les différentes parties (feuilles, tige, racines et fleurs par exemple) collaborent et dépendent l'une de l'autre afin d'assurer la survie et la reproduction de la plante. Les concepts de totipotence et de différenciation cellulaire sont décrits afin de mettre en contexte les différences entre les végétaux dans leur environnement naturel et les cellules cultivées *in vitro*. La connaissance de la nature et des particularités physiologiques des cellules utilisées lors de ce projet est essentielle à la compréhension du système modélisé. L'information contenue dans cette section est tirée du livre *Principles of cell biology* (Kleinsmith et Kish, 1988).

Chez les végétaux, la division cellulaire et la croissance est normalement restreinte à des régions appelées méristème. Ces régions se retrouvent notamment dans la partie apicale des racines, des jeunes pousses et des bourgeons. Les cellules composant le

méristème se divisent rapidement. Une partie de ces cellules reste dans l'état méristématique et demeure en division rapide afin de produire de nouvelles cellules. D'autres, par contre, se spécialisent afin d'assurer une fonction spécifique et cessent de se diviser, elles se différencient. Les différents tissus de la plante sont ainsi formés. Par exemple, les cellules au bout d'une racine demeurent toujours dans l'état méristématique, les cellules à la base du méristème se différencient et la racine s'allonge peu à peu. Les cellules du méristème sont parfois comparées aux cellules souches animales puisqu'elles sont indifférenciées et se divisent rapidement (Yang et Matsubayashi., 2001).

Le processus de différenciation chez les végétaux est réversible. Une cellule pourrait ultimement être dédifférenciée et une plante complète pourrait être régénérée à partir de cette seule cellule. Cette faculté exclusive aux végétaux est nommée totipotence. Dans un organisme multicellulaire, toutes les cellules possèdent un bagage génétique complet. Lors de la différenciation, certains gènes sont inactivés et ces cellules forment les différents tissus. Contrairement aux cellules animales, ces gènes peuvent être réactivés chez les végétaux afin de dédifférencier les cellules des différents tissus.

Certaines parties de plantes ou des cellules dédifférenciées sont cultivées en laboratoire, sous conditions stériles et dans un environnement contrôlé. On parle alors de cultures de tissus végétaux ou de culture de cellules végétales.

### **2.1.1 Historique de la culture des tissus végétaux**

La culture de tissus végétaux en laboratoire remonte à 1902 lorsque l'autrichien Gotlieb Haberlandt (Noé, 1934) posa l'hypothèse qu'il est possible de cultiver des cellules prélevées de végétaux dans un milieu nutritionnel liquide stérile. Cependant, due à la différenciation des cellules utilisées, son expérience fût un échec. Il réussit néanmoins à

maintenir les cellules vivantes dans un milieu de culture non défini pendant plusieurs semaines mais celles-ci ne se divisaient pas (Krikorian et Berquam, 2003). À cette époque, l'existence des phytohormones était inconnue et ce ne fut qu'en 1939, après la découverte des auxines (IAA), que Gautheret et Nobecourt réussirent à établir la première culture permanente *in vitro* de tissus végétaux (calles et racines de *Daucus carotta*) (Pennazio, 2002). En 1957, la découverte de l'effet de synergie entre les auxines et les cythokinines (kinétine) sur la division cellulaire marque le début de l'ère moderne de la culture des cellules végétales. Cette découverte de Miller et Scoog permet de remplacer les bouillons de culture organiques (par exemple, le lait de coco qui contient des auxines et des cythokinines) par des milieux de culture synthétiques dont la composition est définie (Krikorian et Berquam, 2003).

### **2.1.2 Suspensions de cellules végétales**

L'établissement d'une suspension de cellules végétales requiert d'abord qu'une partie de plante soit introduite et maintenue dans un environnement stérile. Un morceau de tissu est prélevé (explant) et stérilisé en l'immergeant dans une solution diluée d'hypochlorite de sodium (eau de javel) ou d'éthanol (Gamborg, 1982). L'explant stérilisé est mis en contact avec un milieu de culture. Celui-ci contient des vitamines, une source de carbone (sucrose ou glucose) ainsi que des macro et micronutriments. Des phytohormones sont également ajoutées (auxines et cythokinines). Ce milieu peut être solidifié avec de l'agar. Un milieu de croissance couramment utilisé est celui de Murashige et Skoog (1962). Plusieurs tissus peuvent être cultivés et on les regroupe sous deux catégories (Roy et al., 2000). Les cultures différenciées impliquent la culture de racines, de pousses (*shoots*) ou de bourgeons. Les cultures indifférenciées se caractérisent par la culture de calles ou de suspensions cellulaires. Ces dernières sont utilisées pour les expériences de ce projet.

Plusieurs explants lorsqu'ils sont mis en contact avec le milieu nutritionnel forment une masse de cellules dédifférenciées appelée calle. Le calle se forme à l'endroit où l'explant est coupé. Ce phénomène est similaire aux masses de cellules produites lorsque l'écorce d'un arbre est endommagé (Panday et al., 1974), le calle produit est un mécanisme de défense servant à sceller la blessure. Le mécanisme de différenciation est inversé puisque le calle est formé à partir de cellules différenciées à proximité de la plaie. Tout ceci est initié sous l'action de phytohormones libérées par la plante qui réagit au stress de la blessure.

Certains calles produits *in vitro* sont friables et le transfert de ceux-ci dans un milieu de culture liquide sous agitation permet à des cellules individuelles ou à de petits amas de s'en détacher. En remplaçant le milieu de culture usé par du milieu de culture frais (sous cultures) et en enlevant graduellement les calles, on obtient éventuellement une suspension cellulaire.

L'examen microscopique d'une suspension cellulaire révèle que les cellules sont soit regroupées en amas fins ou simplement individuelles. La taille des amas est variable selon l'espèce (Misawa, 1994) . La figure 2.1 montre une microphotographie de la suspension cellulaire de *Catharanthus roseus* utilisée lors de ce projet. Les suspensions de cellules végétales ont beaucoup en commun avec les cultures bactériennes. En effet, les courbes de croissance des ces cultures (section 2.4.1) ont la même forme et possèdent une phase de latence, de croissance exponentielle et de plateau (Prescott et al, 1995).

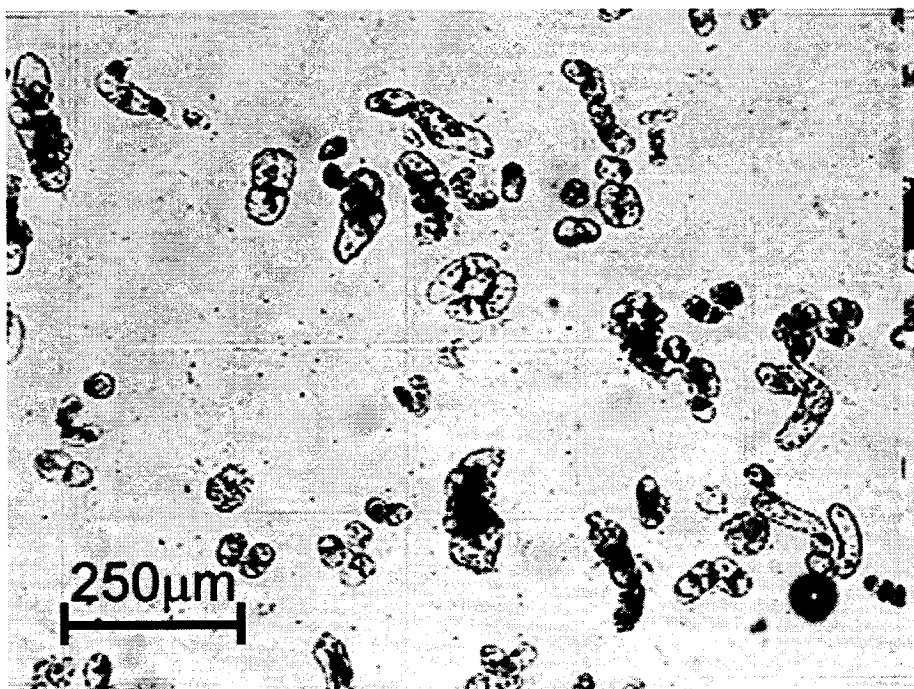


Figure 2-1 : Cellules d'une suspension cellulaire de *Catharanthus roseus* (100X).

## 2.2 Nutrition des cellules végétales

La croissance et la division cellulaire dépend de nombreux facteurs physico-chimiques et biochimiques. L'emphasis de la revue de littérature est placé sur les nutriments et leur rôle sur le métabolisme primaire. Ainsi, les macro et micronutriments sont révisés, le rôle des phytohormones est également rapporté. Les nutriments sont puisés du sol par le système racinaire de la plante. Dans le cas des suspensions cellulaires, ceux-ci sont transportés du milieu de culture au milieu intracellulaire. Le transport membranaire des nutriments est détaillé à la section 2.3.

*Nutriment* est le terme général utilisé pour désigner tout élément ou composé organique ou inorganique qui peut être utilisé par un organisme sans subir de transformation avant son assimilation par les cellules (Tikhomiroff, 2001). Le terme macronutriment désigne



les substances requises en quantités relativement élevées par le métabolisme cellulaire. Les nutriments requis en infimes quantités sont appelés micronutriments.

Tout organisme se procurent d'une manière ou d'une autre des substances nutritives minérales et organiques. Suivant leur mode d'alimentation, les organismes sont dits autotrophes ou hétérotrophes (Weiss, 1966). Un organisme autotrophe ne tire de son milieu que des substances minérales. Avec certaines d'entre elles, il fabrique toutes les substances organiques nécessaires au métabolisme. Au contraire, un hétérotrophe ne peut fabriquer de substances organiques à partir des substances minérales. Le milieu doit lui fournir, outre les substances minérales, des substances organiques préfabriquées.

Les plantes photosynthétiques sont des organismes dits photoautotrophes. Elles utilisent le dioxyde de carbone atmosphérique afin de synthétiser les squelettes carbonés des molécules organiques. Dans le cas des suspensions de cellules végétales, la dédifférenciation rend les cellules incapables de photosynthèse. Une source externe de carbone est fournie sous forme de glucides dissous dans le milieu de culture.

### **2.2.1 Macronutriments**

Les informations contenues dans cette section sont tirées de la revue de littérature du mémoire de Tikhomiroff (Tikhomiroff, 2001).

Le rôle essentiel du potassium est de participer au gradient électrochimique de part et d'autre de la membrane plasmique grâce à sa concentration cytoplasmique intracellulaire élevée qui est de l'ordre de 100 mM (Clarkson et Hanson, 1980).

Le calcium est un messager secondaire pour de nombreux mécanismes de réponse aux signaux environnementaux et hormonaux (Hepler et Wayne, 1985). Il peut être capté par la calmoduline, une protéine cytoplasmique. Le complexe calcium-calmoduline est

impliqué dans la régulation de nombreuses voies métaboliques associées à la réponse à un signal (Sanders et al., 1999).

Le magnésium est aussi un messenger secondaire impliqué dans la régulation de l'expression de gènes et joue un rôle dans l'activation des enzymes impliquées dans la respiration, la photosynthèse et la synthèse d'ADN et d'ARN (Prescott et al., 1995)

Le soufre est utilisé pour les réactions d'oxydoréduction (Bouma, 1975) et est intégré dans deux acides aminés importants, la méthionine et la cystéine. Enfin, il entre dans la composition de plusieurs cofacteurs comme la coenzyme A (Michal, 1999).

Le phosphate est utilisé par la cellule sous forme d'orthophosphate ( $\text{PO}_4$ ) ou phosphate inorganique ( $\text{P}_i$ ) ou de pyrophosphate. Le phosphate possède 3 différents  $\text{pK}_a$  : 2.16, 7.21 et 12.32. Dans les conditions physiologiques des cellules de plantes ( $5 < \text{pH} < 7$  selon les compartiments cellulaires), le phosphate se présente sous deux formes dominantes :  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  et  $\text{HPO}_4^{2-}$ . La cellule ne peut absorber et stocker que le  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  (Bielecki, 1973). Il entre dans la composition des phospholipides, des nucléotides, des nucléosides, des acides nucléiques et de nombreux intermédiaires de réactions phosphatées. Outre ce rôle structural, le phosphate contenu dans les nucléotides triphosphatés tels que l'ATP et le GTP fourni à la cellule des molécules ayant deux liaisons phosphatées extrêmement riches en énergie. Ces molécules servent de navettes énergétiques. L'énergie libérée par la dégradation de molécules complexes (ex : glucides) est utilisée pour la régénération d'ATP. De plus, le  $\text{P}_i$  régule l'activité des protéines par leur phosphorylation et leur déphosphorylation. Selon son état de phosphorylation, une protéine est soit active ou inhibée (Taiz et Zeiger, 1998).

L'azote est extrêmement important pour la plante car les acides aminés contiennent tous au moins un atome d'azote. Ils servent dans la production de protéines, de nucléotides,

d'acides nucléiques, de facteurs de croissance et d'autres métabolites primaires (Wink, 1997). La plante est capable de se servir du nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ), de l'ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) et du diazote ( $\text{N}_2$ ) comme source d'azote. L'azote ne joue pas de rôle énergétique comme le phosphate, si ce n'est qu'il entre dans la composition des nucléotides triphosphatés. L'incorporation de l'azote a lieu par l'incorporation d'un ion ammonium dans le 2-oxoglutarate, un intermédiaire du cycle de l'acide citrique. Cette réaction produit le glutamate, acide aminé utilisé pour les réactions de transamination menant aux autres acides aminés (Michal, 1999). L'incorporation de l'ammonium peut aussi se produire lors de la synthèse de la glutamine (qui possède 2 atomes d'azote) à partir du glutamate. Cela se produit de manière plus spécifique au niveau du cycle de la glutamine synthétase/glutamate synthétase.

Le sucrose est un dimère constitué de deux hexoses, une molécule de glucose et une molécule de fructose. C'est le glucide qu'on retrouve dans la sève des plantes supérieures et qui sert de molécule énergétique pour les plantes. La plante ne peut pas se servir du sucrose directement, elle doit l'hydrolyser en glucose et fructose par l'action des invertases (Sturm et al., 1999). Dans la cellule, le glucose et le fructose sont rapidement phosphorylés en glucose-6-phosphate et en fructose-6-phosphate pour finalement générer de l'énergie via les voies métaboliques de la glycolyse, des pentoses phosphates et du cycle de Krebs.

### **2.2.2 Micronutriments**

Les micronutriments sont les éléments essentiels dont la plante a besoin en très petites quantités. Ces derniers servent généralement de cofacteurs aux réactions enzymatiques et sont des catalyseurs pour une multitude de réactions biochimiques vitales. Leur concentration est de l'ordre du  $\mu\text{M}$  dans les milieux de culture synthétiques. Le tableau 2.1 résume leurs principales fonctions biochimiques.

**Tableau 2-1 : Fonctions des micronutriments\*.**

Hormones	Ions assimilables	Fonctions Principales
Chlore	$\text{Cl}^-$	-Activation des éléments photosynthétiques. (Haehnel, 1984) -Maintient de l'électroneutralité du cytosol. (Clarkson et Hanson, 1980) -Rôle dans la division cellulaire (feuilles et racines). (Terry, 1977)
Fer	$\text{Fe}^{3+}$ , $\text{Fe}^{2+}$	-Constituant des cytochromes (Schmidt, 2003) -Activation des chaînes de transport des électrons (Curie et Briat, 2003)
Bore	$\text{H}_2\text{BO}_3^-$	-Translocation des sucres, Synthèse des acides nucléiques, formation des hydrates de carbone et de l'amidon, synthèse des phytohormones (Bolanos et al., 2004).
Manganèse	$\text{Mn}^{2+}$	-Cofacteur d'enzymes, synthèse des acides aminés. (Fox et Guerinot, 1998)
Zinc	$\text{Zn}^{2+}$	-Cofacteur d'enzymes, synthèse de la chlorophylle (Fox et Guerinot, 1998)
Cuivre	$\text{Cu}^+$ , $\text{Cu}^{2+}$	Constituant de plusieurs enzymes d'oxydoréduction et d'enzymes associées à la synthèse de la lignine. (Fox et Guerinot, 1998)
Molybdène	$\text{MoO}_4^{2-}$	Essentiel à la fixation de l'azote, Cofacteur de la réduction des nitrate. (Crawford, 1995)
Nickel	$\text{Ni}^{2+}$	Cofacteur de l'uréase, métabolisme de l'azote. (Eskew et al., 1984)

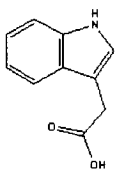
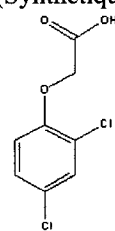
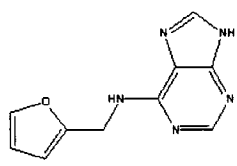
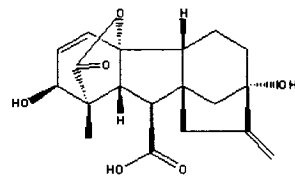
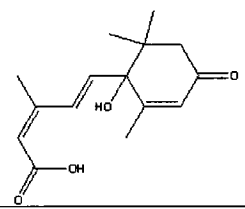
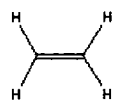
\* : Adapté de Campbell (Campbell, 1995)

### 2.2.3 Phytohormones

Le mot hormone vient du verbe grec qui signifie *exciter*. Le rôle des phytohormones en est un de messenger. C'est un système de communication entre les différentes parties de la plante. Elles ont la particularité de déclencher de changements biochimiques et physiologiques parfois drastiques avec une infime concentration. L'information suivante est adaptée du livre *Biologie* (Campbell, 1995).

Cinq catégories de phytohormones sont connues : Auxines, Cytokinines, gibbérellines, acide abscissique et éthylène. Leur rôle est de réguler la croissance et le développement des végétaux. Elles influencent notamment la division, la différenciation et l'élongation cellulaire en agissant sur l'expression génétique, l'activité des enzymes et les propriétés des membranes cellulaires. De plus, l'action d'une hormone n'est pas régit par sa concentration mais bien par son rapport aux concentrations des autres hormones. Un exemple de ceci est l'effet de synergie entre les auxines et les cytokinines sur la division cellulaire (Krikorian et al., 2003). Le tableau 2.2 résume le rôle des différents types de phytohormones.

**Tableau 2-2 : Fonctions des phytohormones\*.**

Hormones	Site d'action	Fonctions	Exemples
Auxines	Méristème des bourgeons, feuilles.	Stimule l'élongation des tiges, la croissance des racines et la différenciation.	<p>IAA</p>  <p>2,4-D (Synthétique)</p> 
Cytokinines	Synthétisées dans les racines et transporté dans les divers organes.	Influence la croissance des racines et la différenciation. Stimule la croissance et la division cellulaire.	<p>Kinéline</p> 
Gibbérellines	Méristèmes des bourgeons et de racines, jeunes pousses	Favorise la germination, le bougonnement et la croissance des feuilles. Influence la croissance des racines et la différenciation	<p>Acide gibbérellique</p> 
Acide Abscissique	Feuilles, tiges, fruits	Inhibe la croissance, déclenche la dormance	<p>Acide abscissique</p> 
Éthylène	Tissus des fruits en maturation	Favorise la maturation des fruits, s'oppose à l'effet de certaines auxines, favorise ou inhibe (selon l'espèce) la croissance des racines, des fleurs ou des feuilles.	<p>Éthylène</p> 

\* : Adapté de Campbell (Campbell, 1995)

### 2.3 Transport membranaire

Cette section de la revue de la littérature révisé le transport membranaire des macronutriments qui constituent des paramètres du modèle de croissance développé, soit les sources d'azote (nitrate et ammonium), les sources de carbone (sucrose, glucose, fructose) et le phosphate. Une compréhension des mécanismes régissant le transport de ces éléments du point de vue biologique est utile afin d'établir les hypothèses de modélisation..

L'évolution a dotée les végétaux de nombreux outils afin de permettre leur survie faces aux conditions environnementales sans cesse changeantes auxquelles elles sont confrontées (Grossman, 2001). L'acquisition des différentes ressources minérales présentes dans le sol est effectuée par le système racinaire. Les sols étant hétérogènes, la gamme de concentration des ions disponibles est relativement large (Bassirirad, 2000). Le transport d'un nutriment à travers la paroi cellulaire est généralement facilité par des transporteurs qui sont activés et utilisés en fonction de la disponibilité du nutriment. On les regroupe sous deux types, les transporteurs à haute (High Affinity Transport System - HATS) et à basse affinité (Low Affinity Transport System - LATS). Les HATS sont effectifs à des concentrations plus faibles que 500  $\mu\text{M}$  (Chrispeels et al., 1999). Lorsque les concentrations deviennent de l'ordre du mM, les systèmes LATS entrent en fonction et effectuent la majorité du transport. Il est possible d'observer plusieurs transporteurs LATS dans une seule cellule tel qu'illustré à la figure 2.2.

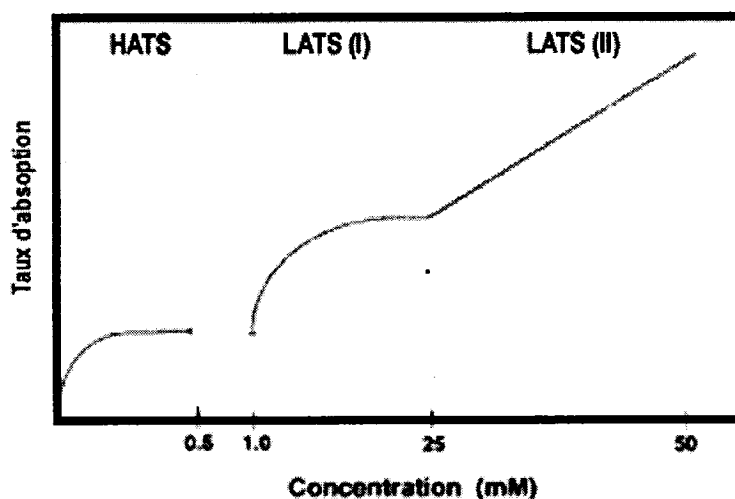


Figure 2-2 : Profil de vitesse d'absorption typique d'un nutriment. Adapté de Chrispeels, 1999.

### 2.3.1 Transport de l'azote

Le transport des sources d'azote à travers la membrane des cellules végétales est un sujet largement étudié par la communauté scientifique (Williams et Miller, 2001). De nombreuses études sont disponibles sur les transporteurs membranaires d'azote et ce au niveau moléculaire, génétique et physiologique. Certains auteurs étudient le phénomène d'un point de vue plus macroscopique en mesurant les flux d'azote sur des plantes entières, des tissus ou des cellules. Les sources d'azote couvertes dans cette section sont les ions nitrate et ammonium. L'absorption de ces deux ions est un phénomène complexe qui dépend de plusieurs facteurs environnementaux, génétiques et est différent d'une espèce à l'autre.



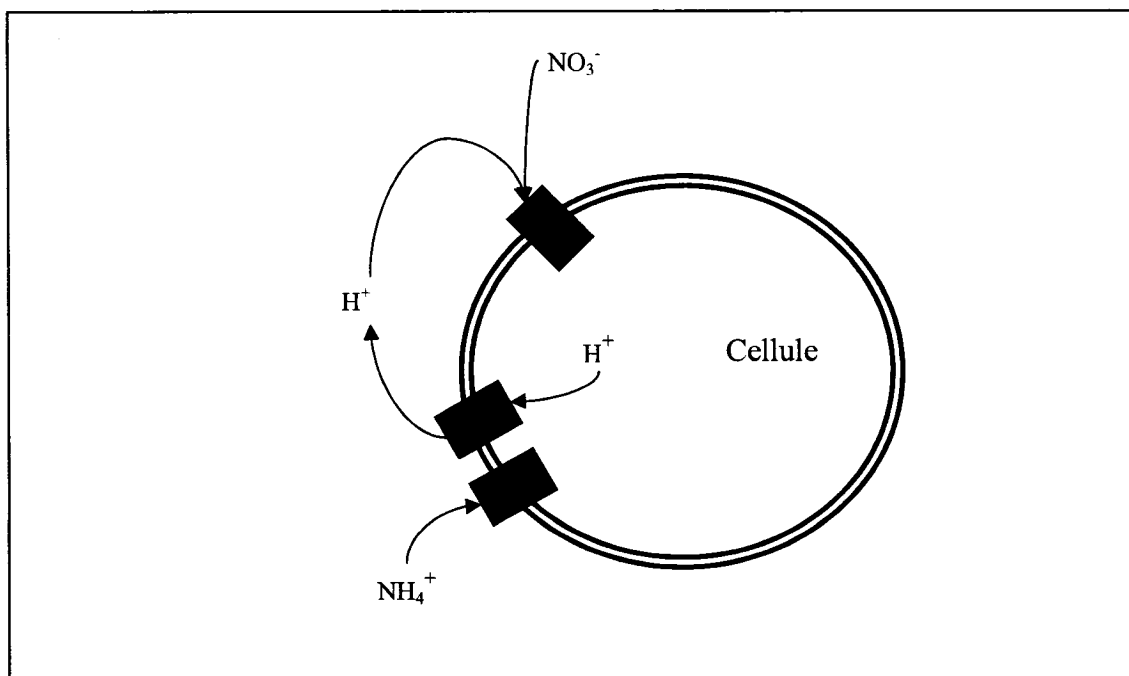
## **Nitrate**

Trois systèmes de transport du nitrate ont été identifiés (Glass et al., 2001). Un de ces systèmes de transport est à haute affinité et constitutif (cHATS), c'est-à-dire qu'il n'est pas régulé par les conditions environnementales et est toujours exprimé par la cellule. Ce système permet l'entrée du nitrate à l'intérieur de la cellule à des concentrations externes relativement faibles. La cinétique de l'activité de ce transporteur suit une cinétique de Michaelis-Menten ayant un  $K_m$  entre 2 et 20  $\mu\text{M}$  (Crawford et Glass, 1998). Lorsque la cellule est exposée au nitrate après une période de privation, un deuxième système à haute affinité est induit (iHATS). L'expression génétique des iHATS est éventuellement inhibée (6 à 8 heures) après l'exposition au nitrate (Williams et Miller, 2001). Cette régulation est attribuée à l'accumulation de formes réduites d'azote (dont le  $\text{NH}_4^+$ ) dans les cellules. Ce transport est caractérisé par une cinétique de Michaelis-Menten avec des  $K_m$  entre 20 et 100  $\mu\text{M}$  (Chrispeels, 1999).

Le transport par les systèmes à basse affinité est constitutif (cLATS) et devient apparent entre 0.2 et 0.5 mM (Glass et al. 2001). Ce type de transport n'est pas saturant, même à des concentrations en nitrate externes aussi élevées que 50 mM. La vitesse du transport augmente linéairement en fonction de la concentration disponible. Certains auteurs ont suggéré que ce transport était de la diffusion passive mais des études thermodynamiques ont démontrées que c'était bel et bien du transport actif (Crawford et al., 1998).

L'identification des transporteurs des nutriments et la détermination de leur cinétique provient d'études sur des protéines isolées et des analyses de flux précises à l'aide d'isotopes radioactifs (Garnett et al., 2003). La consommation apparente du nutriment pendant une culture de cellules végétales est la somme de la consommation des cellules et de tous les transporteurs qui s'y trouvent. Dans le cas d'une suspension cellulaire de

*nicotina tabacum*, la consommation apparente est adéquatement représentée par une équation de Michaelis-Menten biphasique. Les taux d'absorption maximaux et la valeur de  $K_m$  varient en fonction de la concentration intracellulaire en  $\text{NO}_3$ , en  $\text{NH}_4$  et en acides aminées tel la glutamine et le glutamate (Zhang et Mackown, 1993). La présence de  $\text{NH}_4^+$  dans le milieu extracellulaire a un effet inhibiteur sur l'absorption du nitrate pour des racines de persil (Kronzucker et al., 1999). La présence de 4 mM d'ammonium dans le milieu de culture a pour effet de réduire rapidement l'influx de nitrate. La préférence de l'absorption de l'ammonium en début de culture a pour effet d'acidifier le milieu de culture. Cette acidification est due au mécanisme d'absorption qui est couplé à une pompe à proton et qui permet d'équilibrer les charges en expulsant des ions  $\text{H}^+$  (figure 2.3). L'acidification du milieu promeut l'absorption du nitrate qui est effectuée par le biais d'un transport de type symport Anion- $\text{H}^+$  (Shin et al., 2003). La charge négative du nitrate est balancée par le transport simultané d'un ion  $\text{H}^+$  tel qu'illustré à la figure 2.3.



**Figure 2-3 :** Schéma du transport membranaire du nitrate et de l'ammonium.

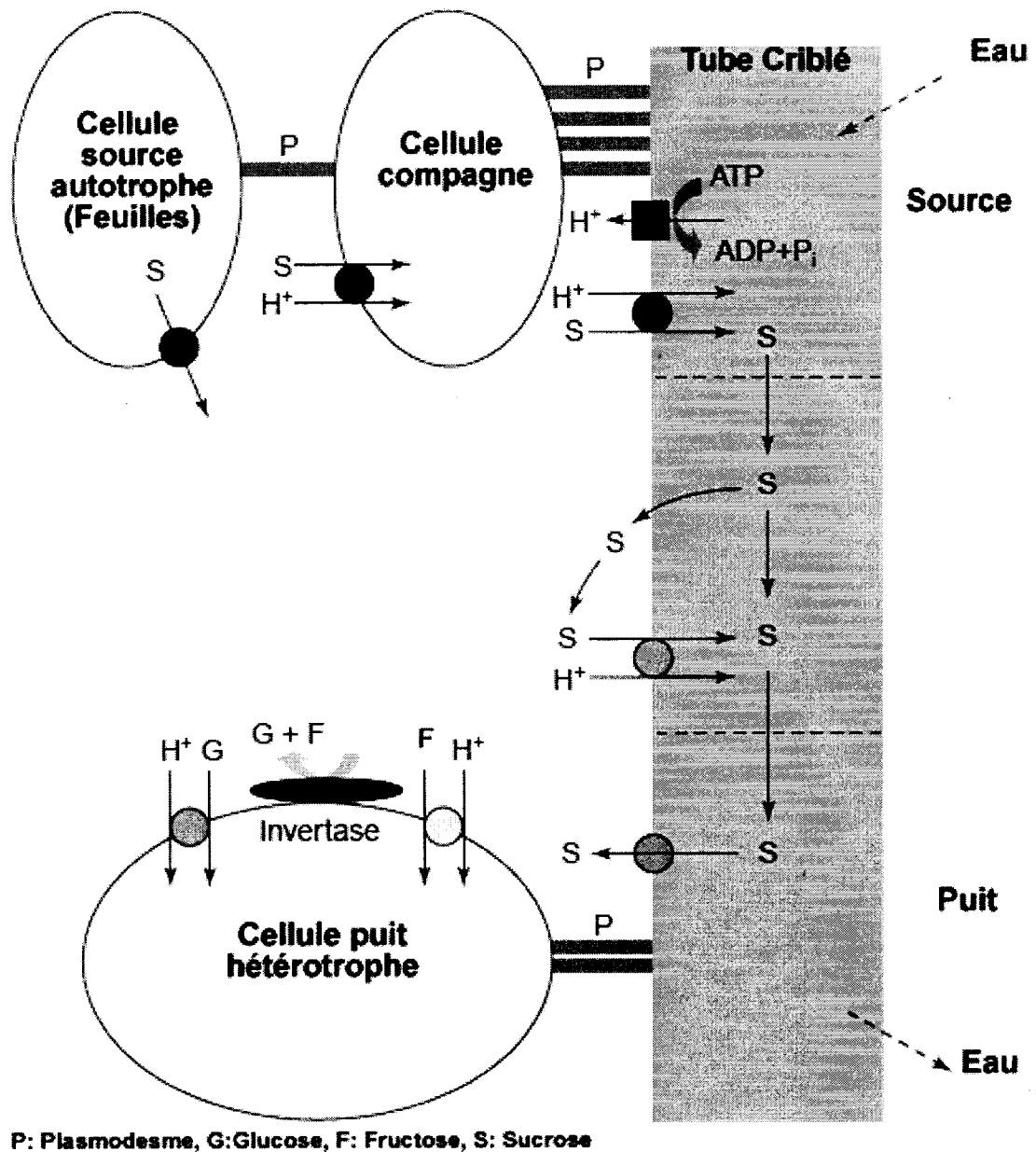
### **Ammonium**

La littérature disponible sur le transport de l'ammonium est moins substantielle que pour le nitrate (Wang et al, 1993). Ceci s'explique par le fait que celui-ci est généralement disponible en faibles concentrations dans le sol comparativement au nitrate et que les études de transport sont souvent effectuées dans un but agricole. Les cellules végétales possèdent deux systèmes de transport de l'ammonium (Glass et al, 2001, Wang et al., 1993). Comme pour le nitrate, un système inductible à haute affinité (iHATS) est présent pour l'ammonium. Sa cinétique suit celle de Michaelis-Menten avec un  $K_m$  entre de 10 et 200  $\mu\text{M}$  (Williams et Miller, 2001) et son taux d'absorption maximal est relativement faible (Grossman, 2001). L'expression des transporteurs iHATS est stimulée par une privation en azote mais est rapidement inhibé par

l'accumulation de glutamine intracellulaire. Le système à basse affinité (LATS) est constitutif et non saturant jusqu'à 50 mM pour des cellules de riz (Glass et al, 2001). Les transporteurs qui y sont associés sont des canaux ioniques (Williams et Miller, 2001).

### **2.3.2 Transport des sources de carbone**

Chez les plantes, la synthèse des sucres s'effectue au niveau des cellules du mésophile des feuilles matures. (Williams et al. 2000). Ces cellules sont dites sources de carbone et sont responsables d'approvisionner toutes les autres cellules de la plante (puits de carbone) en sucrose. Le transport de la source aux puits est assuré par la sève qui circule dans le phloème (Nader, 1987). La figure suivante illustre le transport du sucrose. Il est acheminé des feuilles aux cellules puits. Le sucrose n'est pas directement absorbé par les cellules puits mais est d'abord hydrolysé par les acides invertases présentes sur les membranes. L'hydrolyse scinde le sucrose en une molécule de glucose et de fructose. Tel que mentionné à la section 2.1, les suspensions cellulaires cultivées *in vitro* ne sont pas différenciées et n'ont donc pas la capacité de synthétiser une source de carbone par photosynthèse. Elles sont qualifiées d'hétérotrophes puisqu'elles dépendent d'une source externe de carbone. Des glucides doivent être inclus dans le milieu de culture afin d'assurer la survie des cellules.



**Figure 2-4 :** Schéma du transport du sucrose chez les végétaux. Adapté de Williams.  
(Williams et al. 2000)

On distingue deux types de transporteurs de glucides chez les végétaux supérieurs (Williams et al. 2000), les transporteurs de disaccharides, pour le sucrose et les transporteurs de monosaccharides qui ont la capacité de faciliter le transport d'une

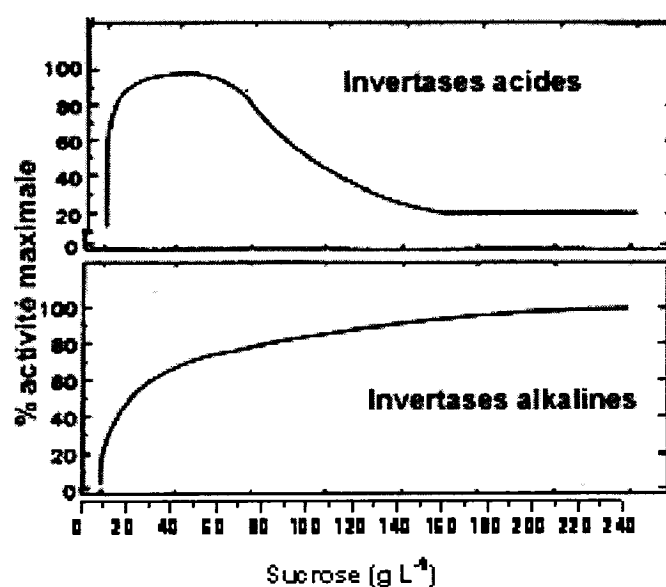
gamme variable de sucres simples selon les espèces (Butner et Sauer, 2000). Le sucrose et le glucose sont les hydrates de carbone les plus couramment utilisés en laboratoire. D'autres sucres peuvent également supporter la croissance des cellules : Le fructose et le maltose pour plusieurs espèces (Misawa, 1994), le sorbitol et l'amidon entre autre pour *glycine max* (Yen et al., 1999). Le transport de ces sucres à travers la membrane est assuré par diverses protéines membranaires qui facilitent l'absorption. Le sucrose, un disaccharide formé de glucose et de fructose, est particulier puisqu'il peut être hydrolysé par les invertases membranaires ou être simplement transporté intact, selon les tissus (figure 2.4).

### 2.3.2.1 Hydrolyse du Sucrose

Les transporteurs de sucrose sont principalement localisés sur les parois du phloème et dans les cellules autotrophes (feuilles). Cependant, dans le cas des suspensions cellulaires hétérotrophes, le sucrose n'est pas directement absorbé par les cellules. Il est plutôt hydrolysé en glucose et en fructose dans le milieu extracellulaire par les invertases membranaires.

Ces enzymes sont fixées sur la parois extracellulaire des membranes par une liaison ionique (Klann et al., 1996). Plusieurs types d'invertases sont présentes pour une même espèce. On les distingue par leur pH optimal. Les invertases acides sont actives à des pH entre 4.5 et 6.0 alors que les invertases alcalines agissent entre 7.0 et 7.8 (Sturm et Tang, 1999). Elles présentent des activités différentes en fonction de la concentration en sucrose. La figure 2.5 présente ces cinétiques. Les invertases acides saturent rapidement et des valeurs de  $K_m$  entre 0.3 et 1 g/L sont observées (Black et al., 1995). L'activité est éventuellement inhibée vers 50 g/L. Dans le cas des invertases alcalines, l'activité de l'enzyme atteint son plein potentiel à des concentrations élevées (>240 g/L) et il n'y a pas d'inhibition par le substrat décelée. Les  $K_m$  typiques sont de l'ordre de 3

à 5 g/L (Black et al., 1995). Puisque le pH des suspensions de cellules végétales utilisées lors de ce projet est légèrement acide, entre 5.5 et 6.5, les invertases acides sont responsables de l'hydrolyse. De plus, les concentrations en sucrose dans les cultures *in vitro* ne dépassent pas 40 g/L. Donc, l'activité perçue des invertases acides ne devrait pas montrer d'inhibition par le substrat et être du type Michaelis-Menten.



**Figure 2-5 :** Activité des invertases en fonction de la concentration en sucrose.  
Adapté de Black et al., 1995.

### 2.3.2.2 Transport du glucose et du fructose

Le transport des hexoses (sucres à six carbones) chez les cellules végétales est principalement effectué par une famille de co-transporteurs du type  $H^+$ -symport (Tanner et Caspari, 1996). Des études avec des suspensions de cellules végétales sur l'absorption des hexoses fournissent de précieuses informations sur la dynamique du système étudié dans ce projet. Oliveira (Oliveira et al. 2002) a étudié l'absorption du

glucose chez *Olea Europaea* en fournissant différents hexoses aux cultures en plus du glucose. Il conclut que le fructose, le galactose et le xylose sont des inhibiteurs compétitifs à l'absorption du glucose et que tout ces hexoses partagent le même transporteur. De plus, le mannitol n'est pas reconnu par le transporteur et n'affecte pas l'absorption du glucose, réfutant l'hypothèse que la pression osmotique exercée par les sucres influence les cinétiques d'absorption. Il conclut que le transport des hexoses s'effectue par un seul type de transporteur ayant une spécificité différente pour plusieurs hexoses ( $K_m$  entre 0.002 et 0.02 g/L). Le glucose est favorisé par rapport au fructose. Une réponse différente de l'absorption du glucose et du fructose est également rapportée par Krook et Linus(2000) pour *Daucus carota*. En fournissant seulement du glucose ou du fructose aux cultures, les vitesses d'absorption observées sont sensiblement identiques pour les deux sucres. En fournissant les deux hexoses simultanément et en quantité égale, la vitesse d'absorption du fructose est réduite de 50% alors que celle du glucose est inférieure de 15%. En présence de sucrose, il observe une hydrolyse rapide en quantité équimolaire de glucose et fructose dans le milieu extracellulaire. Par la suite, le glucose est préférentiellement absorbé au fructose. Le même phénomène est observé pour *Phaseolus vulgaris* (Botha et O'Kennedy, 1998). Leurs expériences avec du sucrose démontrent que lorsque le glucose est totalement absorbé, la vitesse d'absorption du fructose se rétablit à des valeurs comparables à celle du glucose. L'auteur conclut que les transporteurs ont une affinité plus grande pour le glucose.

### 2.3.3 Transport du phosphate

Les systèmes de transport du phosphate ont la particularité de saturer à basse concentration lorsqu'on les comparent à ceux des ions azotés. Les végétaux ont évolués de façon à pouvoir extraire cet ion relativement rare du sol. Sa concentration y est rarement supérieure à 10 $\mu$ M (Schachtman et al., 1998, Raghothama, 1999). La



diffusion lente de l'ion dans le sol a pour effet de créer des zones particulièrement pauvres en périphérie des racines (Rausch et Buchner, 2002). Différentes réponses morphologiques, physiologiques, biochimiques et moléculaires incluant l'élongation et l'architecture des racines (Rausch et Buchner, 2002), la sécrétion d'acides organiques afin d'accroître la mobilité du phosphate dans le sol (Grossman, 2001) et des transporteurs à haute affinité (Smith et al., 2003) permettent d'assurer la survie de la plante. Le stockage intracellulaire est également un mécanisme permettant de subvenir aux besoins métaboliques durant les périodes d'épuisement (Shimano et Ashihara, 2006).

On distingue toujours deux systèmes de transporteurs de phosphate, haute et basse affinité (Grossman, 2001, Raghothama, 1999, Schachtman et al., 1998). La composante à haute affinité possède un  $k_m$  entre 3 et 7  $\mu\text{M}$  alors que le système constitutif à basse affinité, sa valeur varie de 50 à 330  $\mu\text{M}$  (Schachtman et al. 1998). Le gradient de concentration entre le milieu extracellulaire (10 $\mu\text{M}$ ) et intracellulaire (1 à 10 mM – Rausch et Buchner, 2002) est particulièrement sévère. La force motrice nécessaire au transport est fournie par le co-transport d'un proton via un symport  $\text{H}^+/\text{H}_2\text{PO}_4^-$  (Poirier et Buchner, 2002).

## **2.4 Modélisation de suspensions de cellules végétales.**

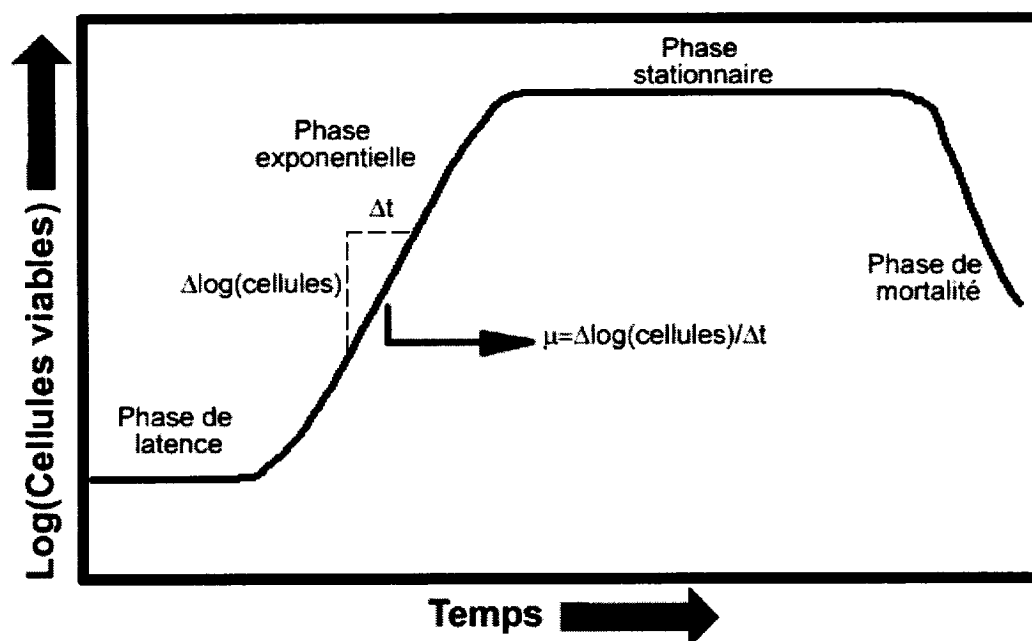
L'intérêt de la culture de cellules végétales du point de vue de l'ingénieur est de mettre les cultures en flacons effectuées en laboratoire à l'échelle industrielle afin d'obtenir un procédé en bioréacteur économiquement viable. La nature biologique du système rend les considérations de design particulièrement délicates. En effet, on peut considérer le métabolisme cellulaire comme étant le réel procédé de production. La plupart des composés industriellement produits par culture cellulaire le sont parce que la synthèse chimique de ceux-ci est soit impossible ou trop complexe pour assurer un succès commercial. On exploite donc les mécanismes biochimiques cellulaires et le but du bioprocédé est de contrôler les conditions environnementales afin de favoriser le métabolisme vers la production des composés convoités. Dans cette optique, une compréhension approfondie de l'impact des variables, non seulement physiques mais également biologiques, sur le système est nécessaire. La phase de croissance d'une culture de cellules végétales dans un bioprocédé industriel doit permettre d'atteindre les concentrations cellulaires désirées le plus rapidement possible tout en amenant les cellules dans un état physiologique idéal à la production. La modélisation de la croissance d'une suspension cellulaire végétale permet de représenter mathématiquement l'impact des facteurs environnementaux. On augmente la compréhension du système en tentant de réduire la complexité des phénomènes biologiques par des simplifications mathématiques basées sur des hypothèses vérifiées expérimentalement.

### **2.4.1 Concepts généraux**

La variable représentant la croissance doit quantifier les cellules présentes dans la suspension. Diverses mesures sont répertoriées dans la littérature : Le volume de cellules (PCV ou *packed cell volume*-Roy et al., 2000), la conductivité du milieu de

culture (Hahlbrock, 1975), la biomasse humide (WW, *wet weight* ou *fresh weight*-Holme, 1998), la biomasse sèche (DW, *Dry weight*) et le dénombrement cellulaire. Ces mesures sont exprimées par rapport au volume de culture et sont des concentrations. Les mesures les plus communes sont le WW et le DW. Certains auteurs suggèrent l'utilisation du DW et de la concentration cellulaire afin de décrire adéquatement la croissance cellulaire (Sirois, 2000, Pépin et al., 1995).

Le profil de la concentration cellulaire dans le temps est appelé courbe de croissance et possède une forme typique pour des cultures bactériennes, végétales et animales. L'information suivante est tirée de Prescott et al., 1995.



**Figure 2-6** : Courbe de croissance typique.

Quand les cellules sont introduites dans un milieu de culture frais, la division cellulaire n'est généralement pas immédiatement observée, ces dernières s'adaptent au nouvel environnement, le métabolisme s'ajuste afin de commencer la division. La durée de la

phase de latence varie en fonction de l'âge de la sous culture, de la composition du milieu de culture et de l'espèce. L'inoculation d'une sous culture relativement jeune et l'ajustement des concentrations du milieu de culture permettent de réduire le temps de cette phase. Pendant la croissance exponentielle, les cellules se divisent à la vitesse maximale possible étant donné leur potentiel génétique et les conditions de cultures. La vitesse est constante et la concentration cellulaire double à intervalles de temps réguliers. C'est le moment où la population est la plus uniforme chimiquement et physiologiquement. La phase stationnaire survient lorsque la capacité maximale du système est atteinte, les conditions environnementales font en sorte que le taux de mortalité cellulaire est égal au taux de division. La limitation en oxygène dissous ou par un nutriment sont les causes les plus évidentes. Lorsqu'un nutriment est complètement épuisé ou que l'accumulation des déchets devient toxique, les cellules meurent rapidement. La phase de mortalité survient, comme la phase exponentielle, à des vitesses logarithmiques. Il est possible d'éventuellement observer une réduction du taux de mortalité lorsque les cellules les plus faibles de la population sont mortes et que seulement les plus résistantes ont survécues. Le vitesse à laquelle les cellules se divisent est exprimée par le taux de croissance ( $\mu$ ). Celui-ci représente le nombre de générations par unité de temps. La modélisation de la phase de croissance nécessite la détermination d'une expression du taux de croissance qui est fonction des paramètres étudiés. Ceux-ci sont souvent les concentrations en nutriments.

#### **2.4.2 Types de modèles.**

Tel que stipulé par Sirois (Sirois, 2000), un modèle peut être prédictif ou descriptif. Un modèle prédictif est mathématiquement autonome. C'est-à-dire qu'en ne fournissant que les conditions initiales, le système d'équation le composant calcul la valeur de toutes les variables en fonction du temps. Par exemple, si le taux de croissance dépend de la concentration en glucides, la concentration de ceux-ci doit également être exprimée mathématiquement en fonction du temps. L'utilité d'un tel modèle est

d'améliorer la compréhension d'une culture en fonction des facteurs environnementaux et prédire le comportement des variables après une perturbation.

Les modèles descriptifs sont des modèles prédictifs auxquels on ajoute des relations à des variables dont la valeur est mesurée en temps réel afin d'estimer des variables non mesurées. Ils permettent donc de suivre en temps réel, l'évolution de variables de cultures non mesurées et d'optimiser les conditions de cultures en ligne.

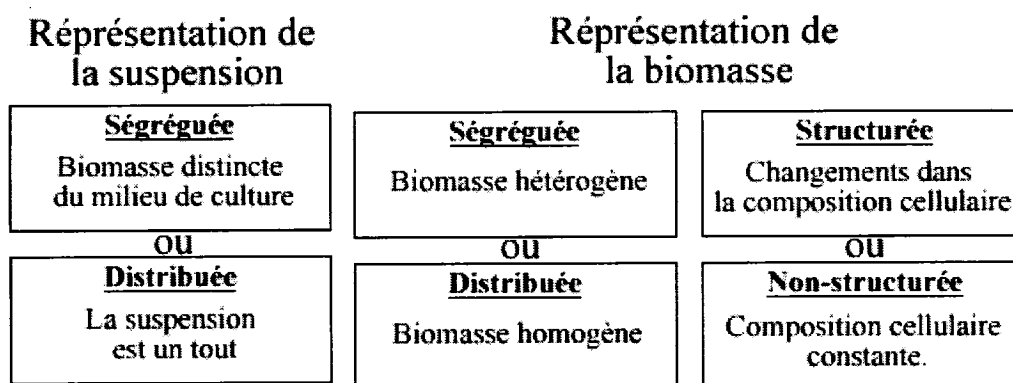


Figure 2-7 : Caractéristiques des modèles de croissance.

Selon la représentation de la biomasse dans le modèle, on peut définir ce dernier en utilisant la classification proposée par Barford et Hall (1978), voir figure 2.7. On qualifie un modèle qui distingue la biomasse du milieu de culture de suspension ségrégée. Si le modèle considère que la biomasse n'est pas uniforme la biomasse est ségrégée. Finalement, un modèle structuré tient compte des changements de la composition cellulaire.

### 2.4.3 Modèles prédictifs recensés

Cette section présente des modèles prédictifs de la croissance de cellules végétales recensés dans la littérature. La nomenclature de ceux-ci est adaptée pour uniformiser les notations utilisées dans ce mémoire. Ils sont présentés en ordre chronologique.

#### King 1977

King (1977) propose un modèle simple décrivant l'évolution de la concentration cellulaire ( $C$ ) de *Acer pseudoplatanus* suite à un changement de la concentration d'un nutriment ( $n$ ) limitant de  $n_1$  à  $n_2$  (glucose et nitrate) :

$$C = Y_{c/n} n_1 \left[ \frac{n_2}{n_1} - \left( \frac{n_2}{n_1} - 1 \right) e^{-Dt} \right] \quad 2-1$$

Le modèle est distribué au niveau de la suspension et de la biomasse. Il n'est utile que pour des cultures limitées par un seul nutriment et dont la concentration est maintenue constante par une alimentation continue (chémostat).

#### Grm et Mele 1980

Ce modèle de croissance fut développé pour étudier la production d'alcaloïdes ( $P$ ) de *Claviceps purpurea* en cultures cuvées. La croissance est mesurée par la biomasse sèche. La vie d'une cellule est divisée en quatre étapes: l'assimilation des nutriments, la division cellulaire, la maturation pendant laquelle les cellules ne se divisent plus mais ont la capacité de produire des alcaloïdes ( $P$ ) et finalement la mortalité. Le phosphate est le nutriment limitant pour les deux premières étapes si les sources de carbone sont

fournies en excès. La biomasse sèche est divisée en quatre groupes, A, B, C et D correspondant aux étapes mentionnées ci haut. Ainsi, le modèle est non structuré, ségrégué par rapport à la biomasse et distribué pour la suspension. Les équations du modèles sont :

$$\frac{dX_A}{dt} = -\mu_1 X_A + \mu_2 X_B \quad 2-2$$

$$\frac{dX_B}{dt} = 2\mu_1 X_A - (\mu_2 + \mu_3) X_B \quad 2-3$$

$$\frac{dX_C}{dt} = \mu_3 X_B - (\mu_4 + \mu_5) X_C \quad 2-4$$

$$\frac{dX_D}{dt} = \left(1 - \frac{1}{Y_{X_c/P}}\right) \mu_4 X_D - \mu_5 X_D \quad 2-5$$

$$\frac{dCHO}{dt} = -\frac{\mu_1}{Y_{X_A/CHO}} X_A \quad 2-6$$

$$\frac{dP}{dt} = -\frac{\mu_4}{Y_{X_C/P}} X_C \quad 2-7$$

$$\mu_1 = \begin{cases} \mu_1^0 & t < 48h. \\ \mu_1^0 e^{-b_1(t-48)} & t \geq 48h. \end{cases} \quad 2-8$$

$$\mu_2 = \begin{cases} \mu_2^0 & t < 48h. \\ \mu_2^0 e^{-b_2(t-48)} & t \geq 48h. \end{cases} \quad 2-9$$

Cette approche est intéressante puisque la ségrégation de la biomasse permet de modéliser la phase de latence ( $X_A$ ) et de mortalité ( $X_D$ ). La période d'assimilation des nutriments (étape A) est fixée à 48 heures par les équations 2.8 et 2.9.

**Pažoutová et al. 1981**

Ce modèle est également utilisé pour la production d'alcaloïdes (P) de *Claviceps purpurea*. Il inclut la concentration intracellulaire de phosphate (mmol/gDW) dans l'expression du taux de croissance. C'est donc un modèle non structuré avec suspension ségréguée. La biomasse est distribuée.

$$\frac{dX}{dt} = \mu_1 (1 - e^{-K_1 PO_{4i}}) X + K_2 X^2 \quad 2-10$$

$$\frac{dPO_4}{dt} = -V_{PO_4 MAX} \frac{PO_4}{PO_4 + K_{PO_4}} X + \left( \frac{1}{Y_{X/PO_4}} + PO_{4i} \right) K_2 X^2 \quad 2-11$$

$$\frac{dPO_{4i}}{dt} = -\frac{1}{X} \frac{dPO_4}{dt} - \left( \frac{1}{Y_{X/PO_4}} + PO_{4i} \right) \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \quad 2-12$$

$$\frac{dP}{dt} = V_{P MAX} \frac{K_P}{K_P + PO_{4i}^2} \quad 2-13$$

Où  $V_{n max}$  est la vitesse d'absorption de i maximale et P la concentration de produit (alcaloïdes).



La cinétique de croissance n'est fonction que du phosphate intracellulaire. Le modèle prédit la croissance et la production selon différentes concentrations initiales en phosphate.

**Curtis et al. 1991**

Ce modèle prédit la croissance de la biomasse sèche ( $X$ ) d'une suspension de *Papaver somniferum* en fonction du phosphate intracellulaire ( $PO_{4i}$ ). Il définit une suspension ségréguée, une biomasse distribuée et est non structuré.

$$X = X_{t=0} \left( 1 + \mu \frac{PO_{4i, t=0}}{PO_{4i}} t \right) \quad 2-14$$

$$PO_{4i} = \frac{X_{t=0}}{X} PO_{4i, t=0} - \frac{1}{Y_{x/PO_4}} \quad 2-15$$

$$\mu = K_1 PO_{4i} \quad 2-16$$

Le taux de croissance dépend directement de la concentration intracellulaire de phosphate libre. Il est utilisé par les auteurs pour prédire la croissance linéaire observée lors de cultures limitées en phosphate.

**Van Gulik et al. 1993**

Ce modèle structuré décrit la croissance de la biomasse sèche ( $X$ ) en fonction du phosphate intracellulaire libre ( $PO_{4i}$ ), des composées phosphorylés ( $ppi$ ), des sucres intracellulaires ( $CHO_i$ ) et de la biomasse structurale ( $X_{struc}$ ).

$$X = X_{struc} + pp_i + CHO_i \quad 2-17$$

$$\frac{dPO_{4i}}{dt} = \frac{1}{X} \left[ r_p - \frac{r_{pp}}{Y_{PO_4/pp}} - \left( \frac{dX}{dt} - DX \right) \frac{PO_{4i}}{X} \right] \quad 2-18$$

$$\frac{dpp_i}{dt} = \frac{1}{X} \left[ r_{pp} - \frac{r_{X_{struc}}}{Y_{pp/X_{struc}}} - \left( \frac{dX}{dt} - DX \right) \frac{pp_i}{X} \right] \quad 2-19$$

$$\frac{dCHO_i}{dt} = \frac{1}{X} \left[ r_{CHOi} - r_{CHOi,maint} - \left( \frac{dX}{dt} - DX \right) \frac{CHO_i}{X} \right] \quad 2-20$$

$$\frac{dX_{struc}}{dt} = \frac{1}{X} \left[ r_{X_{struc}} - \frac{r_{X_{struc}}}{Y_{pp/X_{struc}}} - r_l - \left( \frac{dX}{dt} - DX \right) \frac{X_{struc}}{X} \right] \quad 2-21$$

La variation des concentrations extracellulaires du glucose ( $G$ ), du phosphate ( $PO_4$ ) et des produits liés à la lyse cellulaire ( $l$ ) s'expriment par :

$$\frac{dG}{dt} = -r_g + D_g X \quad 2-22$$

$$\frac{dPO_4}{dt} = -r_{PO_4} + D_{PO_4} X \quad 2-23$$

$$\frac{dl}{dt} = -r_l + D_l X \quad 2-24$$

Les taux de réaction ( $r$ ) sont définis par :

$$r_g = r_{pp} + \frac{r_{X_{struc}}}{Y_{CHO/X_{struc}}} + r_{CHOi} - r_{g,maint} \quad 2-25$$

$$r_{pp} = V_{pp,\max} X_{struc} \frac{PO_{4i}/X}{K_1 + PO_{4i}/X} \frac{G}{K_2 + G} \quad 2-26$$

$$r_{X_{struc}} = V_{X_{struc},\max} X_{struc} \frac{pp_i/X}{K_3 + pp_i/X} \frac{G}{K_2 + G} \quad 2-27$$

$$r_{CHOi} = V_{CHOi,\max} X_{struc} \frac{G}{K_2 + G \left( 1 + \frac{PO_{4i}/X}{K_4} \right)} \quad 2-28$$

$$r_{g,\text{maint}} = V_{g,\text{maint},\max} X_{struc} \frac{G}{K_5 \left( CHOi/X \right) + G} \quad 2-29$$

$$r_{CHOi,\text{maint}} = V_{CHOi,\text{maint},\max} X_{struc} \frac{K_5 \left( CHOi/X \right)}{K_5 \left( CHOi/X \right) + G} \quad 2-30$$

Avec les  $r_{i,\text{maint}}$  qui représentent le taux d'utilisation du composé pour la maintenance cellulaire. La production de  $CO_2$  et la consommation d'oxygène sont également estimées respectivement par des bilans sur le carbone et le degré de réduction des composés:

$$r_{CO_2} = r_g - r_{pp} - r_{X_{struc}} - r_{CHOi} + r_{CHOi,\text{maint}} \quad 2-31$$

$$r_{O_2} = \frac{1}{4} \left[ \gamma_g \left( r_g - r_{CHOi} + r_{CHOi,\text{maint}} \right) - \gamma_X \left( r_{pp} + r_{X_{struc}} \right) \right] \quad 2-32$$

Avec  $\gamma_g$  est le degré de réduction du glucose et  $\gamma_X$  le degré moyen de réduction de la biomasse de *C. roseus*. Bien que ce modèle contienne plusieurs équations, seulement cinq constantes sont estimées par minimisation de l'erreur d'estimation. Les autres sont mesurées expérimentalement ou tirées de la littérature.

**Takeda et al. 1998**

Ce modèle estime les concentrations des sucres ( $CHO$ ) et du phosphate ( $PO_4$ ) extracellulaires, des intermédiaires de respiration ( $i_r$ ), des sucres intracellulaires ( $CHO_i$ ) et de trois type de biomasses : structurale ( $X_S$ ), sèche ( $X_{DW}$ ) et humide ( $X_{WW}$ ). Il est développé pour une suspension cellulaire de *Carthamus tinctorius*. Le modèle est défini par le système d'équations suivant :

$$\frac{dCHO}{dt} = -K_1 \frac{CHO}{CHO + K_2} X_{struc} \quad 2-33$$

$$\frac{dPO_4}{dt} = -K_3 \frac{PO_4}{PO_4 + K_4} X_{struc} \quad 2-34$$

$$\frac{dCHO}{dt} = -K_1 \frac{CHO}{CHO + K_2} X_{struc} \quad 2-35$$

$$\begin{aligned} \frac{d(i_{r,i} + i_r)}{dt} = & -\frac{dCHO}{dt} X_{struc} - K_5 i_{r,i} - \frac{1}{K_6} (K_5 i_{r,i} - K_7 X_{struc}) \\ & - K_8 \frac{\left( \frac{i_{r,i}}{X_{DW}} \right)}{\left( \frac{CHO_i}{X_{DW}} \right) \left( \frac{PO_{4i}}{X_{DW}} \right)} X_{struc} + K_9 \frac{\left( \frac{CHO_i}{X_{DW}} \right) \left( \frac{PO_{4i}}{X_{DW}} \right)}{\left( \frac{i_{r,i}}{X_{DW}} \right)} X_{struc} \end{aligned} \quad 2-36$$

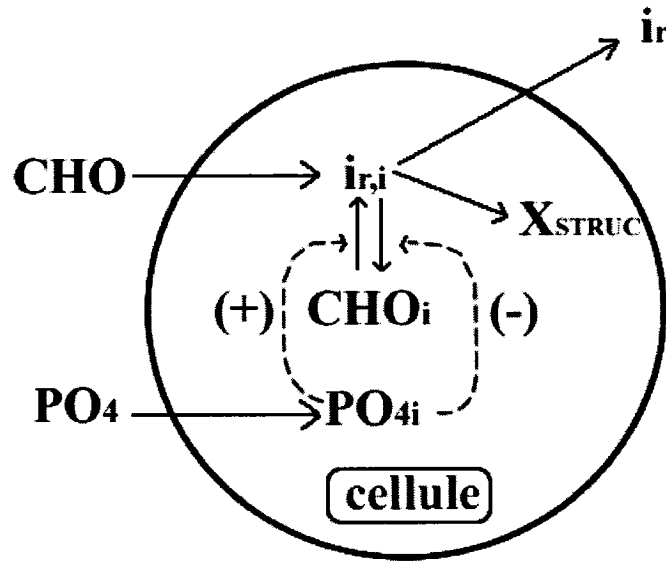
$$\frac{dX_{struc}}{dt} = \frac{1}{K_3} (K_5 i_{r,i} - K_7 X_{struc}) \quad 2-37$$

$$i_r = K_{10} \frac{i_{r,i}}{X_{DW}} \quad 2-38$$

$$X_{DW} = X_{struc} i_{r,i} + CHO_i \quad 2-39$$

$$K_{11} \rho \frac{X_{DW}}{X_{WW}} = CHO + K_{12} \quad 2-40$$

La figure 2.8 illustre le modèle.



**Figure 2-8 :** Schéma du modèle de Takeda et al. (1998).

Le modèle est intéressant puisqu'il inclut la respiration cellulaire dans les bilans de matières. La consommation des sources de carbone n'est pas seulement attribuée à l'accroissement de la biomasse mais également à la respiration cellulaire. Cette approche est une manière élégante de remplacer le nébuleux terme de maintenance ajouté dans certains modèles de croissance (Prakash et Srivatava, 2005, Bailey et Nicholson, 1989). Parmi les constantes du modèle,  $K_1$ ,  $K_5$ ,  $K_8$ ,  $K_9$ ,  $K_{10}$  et  $X_{DW}/X_{struc}$  sont déterminées par minimisation de l'erreur d'estimation du modèle. Les autres sont mesurées ou tirées de la littérature.

### **Bouchard-Marchand 2000**

Ce modèle fut développé pour la croissance de racines transformées de *C. roseus*. La croissance de la biomasse ( $X$ ) dépend des quantités totales à l'intérieur des racines de phosphate ( $PO_{4i,t}$ ), de nitrate ( $NO_{3i,t}$ ) et des glucides ( $CHO_{i,t}$ ). Les taux de croissance sont également inhibés à haute concentration en phosphate extracellulaire ( $PO_4$ ).

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad 2-41$$

$$\mu = \mu_{max} \left(1 - e^{-K_1 PO_{4i,t}}\right) \left(1 - e^{-K_2 NO_{3i,t}}\right) \left(1 - e^{-K_3 CHO_{i,t}}\right) \left(\frac{K_{i1}}{K_{i1} + PO_4^{K_{i2}}}\right) fI \quad 2-42$$

Avec  $K_{i1}$  et  $K_{i2}$ , les constantes d'inhibition et  $fI$ , une fonction sigmoïde utilisée pour adoucir le taux de croissance aux conditions limites. La variation des concentrations extracellulaires est obtenue par les bilans de matière. L'absorption du phosphate et du nitrate est modélisé par une équation à double affinité alors que le bilan des glucides tient compte du taux d'hydrolyse du sucrose ( $\mu_{hyd}$ ) dans le milieu de culture et de l'absorption par les cellules.

$$\frac{dPO_4}{dt} = - \left( V_{max,1,PO_4} \frac{PO_4}{PO_4 + K_{PO_4,1}} + V_{max,2,PO_4} \frac{PO_4}{PO_4 + K_{PO_4,2}} \right) \frac{X}{V} \quad 2-43$$

$$\frac{dNO_3}{dt} = - \left( V_{max,1,NO_3} \frac{NO_3}{NO_3 + K_{NO_3,1}} + V_{max,2,NO_3} \frac{NO_3}{NO_3 + K_{NO_3,2}} \right) \frac{X}{V} \quad 2-44$$

$$\frac{dCHO}{dt} = \mu_{hyd} \frac{X}{V} - \left( V_{max,CHO} \frac{CHO}{CHO + K_{CHO}} \right) \frac{X}{V} \quad 2-45$$

Les bilans des nutriments à l'intérieur des racines sont définis par:

$$\frac{dPO_{4i,t}}{dt} = -\frac{dPO_4}{dt} \frac{V}{X} - \mu PO_{4i} - m_{PO_4} \quad 2-46$$

$$\frac{dNO_{3i,t}}{dt} = -\frac{dNO_3}{dt} \frac{V}{X} - \mu NO_{3i} - m_{NO_3} \quad 2-47$$

$$\frac{dCHO_{i,t}}{dt} = -\frac{dCHO}{dt} \frac{V}{X} - \mu(Y_{CHO/racines} + CHO_i) - m_{CHO} \quad 2-48$$

Ou  $m$  est la consommation du nutriment associé à la maintenance. Finalement, le volume de liquide dans la culture varie en fonction du volume d'eau contenu dans les racines (WW/DW) et du taux d'évaporation (evap) :

$$\frac{dV}{dt} = -\mu X \frac{WW}{DW} - evap \quad 2-49$$

### **Sirois 2000**

La biomasse est décrite selon deux variables mesurées lors de l'échantillonnage des cultures, la biomasse sèche (X) et la concentration cellulaire (C). Sirois propose l'utilisation simultanée de ces deux variables de croissance afin de décrire adéquatement les phénomènes de croissance et d'utilisation nutritionnelle. La variation de X et C est décrite par :

$$\frac{dX}{dt} = \mu_X X \quad 2-50$$

$$\frac{dC}{dt} = \mu_c C \quad 2-51$$

D'après ses observations lors d'expériences sur la caractérisation de la croissance de *E. californica*, l'auteur détermine que l'expression des taux de croissance ( $\mu$ ) est différente pour les deux variables de croissance. Celle de la biomasse sèche dépend de la concentration extracellulaire des sucres ( $CHO$ ) et de l'azote extracellulaire totale ( $N_T = NO_3 + NH_4$ ) selon une cinétique de Michaelis-Menten. Le taux de prolifération cellulaire est également fonction des sources de carbone dans le milieu de culture mais il dépend des concentrations intracellulaires d'azote et de phosphate. Le dernier terme de ces équations en est un d'inhibition afin de tenir compte de l'effet toxique des concentrations ioniques intracellulaires élevées.

$$\mu_X = \mu_{X\max} \left( \frac{CHO}{K_{X,CHO} + CHO} \right) \left( \frac{N_T}{K_{X,N_T} + N_T} \right) \prod_{n=NO_3, PO_4, NH_4} \left( \frac{K_{X,n,1}}{K_{X,n,1} + n^{K_{X,n,2}}} \right) \quad 2-52$$

$$\mu_c = \mu_{c\max} \left( \frac{CHO}{K_{C,CHO} + CHO} \right) \left( \frac{N_{Tj}}{K_{C,N_{Tj}} + N_{Tj}} \right) \left( \frac{PO_{4i}}{K_{C,PO_{4i}} + PO_{4i}} \right) \prod_{n=NO_3, PO_4, NH_4} \left( \frac{K_{C,n,1}}{K_{C,n,1} + n^{K_{C,n,2}}} \right) \quad 2-53$$

La variation des concentrations extracellulaires des ions est obtenues par bilan de matière. Celle-ci varie selon le taux de consommation des cellules, la dilution du milieu de culture (échantillonnage, variation du volume) et du taux d'alimentation :

$$\frac{dn}{dt} = -\phi_n X - Dn + f_n \quad 2-54$$



Où  $n$  est la concentration extracellulaire de  $\text{NO}_3$ ,  $\text{NH}_4$  ou  $\text{PO}_4$ ,  $\phi$  est le taux d'absorption des cellules,  $f$  le taux d'alimentation. Le taux de dilution ( $D$ ) est défini par :

$$D = \frac{1}{V} \left( Q_{\text{éch}} + \frac{dV}{dt} \right) \quad 2.55$$

$$\text{avec } \frac{dV}{dt} = V \sum_{n=\text{NO}_3, \text{NH}_4, \text{PO}_4, \text{CHO}} \frac{f_n}{C_{n,f}} - Q_{\text{éch}} \quad 2.56$$

où  $Q_{\text{éch}}$  est le taux du volume d'échantillonnage,  $V$ , le volume total de la culture et  $C_{n,f}$  la concentration de  $n$  dans le débit d'alimentation. Notons que les termes d'alimentations sont nuls pour les cultures en cuvée.

Le taux d'absorption du phosphate ( $\phi_{\text{PO}_4}$ ) utilisé par Sirois est constant à 0.003 mmol/gDW/h. Celui du nitrate varie linéairement en fonction de sa concentration extracellulaire avec une pente de 0.0035 L/gDW/h. L'absorption de l'ammonium est constante mais possède une valeur différente en fonction du contre ion utilisé dans le milieu de culture (0.016 mmol/gDW/h pour  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  et 0.025 mmol/gDW/h pour  $(\text{NH}_4)_2\text{Citrate}$ ).

Les sucres sont consommés directement avec l'accroissement de la biomasse sèche selon le rendement  $Y_{\text{CHO}/X}$ . La concentration intracellulaire n'est pas considérée, l'hypothèse que ceux-ci sont convertis en biomasse dès leur entrée du côté intracellulaire est posée. La variation de la concentration des sources de carbone est définie par:

$$\frac{d\text{CHO}}{dt} = -\frac{1}{Y_{\text{CHO}/x}} X - D\text{CHO} + f_{\text{CHO}} \quad 2.57$$

Les bilans de matière intracellulaires permettent d'obtenir la variation de concentration des ions intracellulaires. Ceux-ci sont calculés par rapport à la concentration cellulaire. Le terme d'entrée correspond au taux d'absorption des cellules et le terme de consommation correspond à l'accroissement de la concentration cellulaire selon un rendement  $Y_{n/C}$ . Le dernier terme tient compte de la dilution.

$$\frac{dn_i}{dt} = \phi_n \left( \frac{X}{C} \right) - \frac{1}{Y_{n/C} C} \frac{dC}{dt} - Dn_i \quad 2-58$$

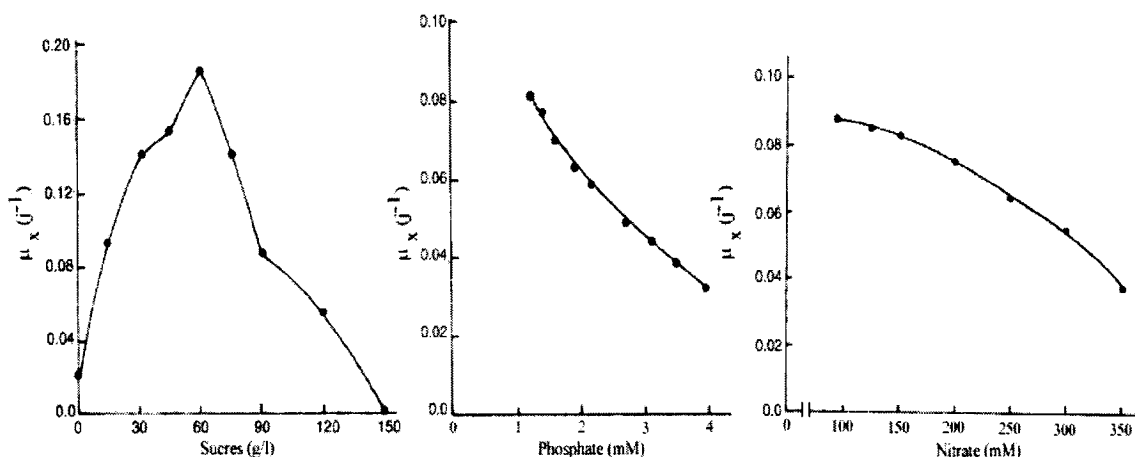
Où  $n_i$  est la concentration intracellulaire de  $NO_3$ ,  $NH_4$  ou  $PO_4$ .

Les rendements déterminés par Sirois sont de 0.31 gDW/g,  $6.6 \times 10^9$  cellules/mmol,  $0.3 \times 10^9$  cellules/mmol et  $0.3 \times 10^9$  cellules/mmol pour les glucides, le phosphate, le nitrate et l'ammonium respectivement. Les paramètres des taux de croissance non déterminés expérimentalement (les  $\mu_{max}$ , les  $K_x$  et  $K_c$  et les constantes d'inhibition  $K_1$  et  $K_2$ ) sont déterminées avec des simulations numériques. L'erreur d'estimation de la biomasse sèche et du dénombrement cellulaire est minimisée pour douze cultures cuvées en flacons. Le modèle est finalement validé par trois cultures cuvées alimentées en bioréacteur afin d'apprécier la capacité du modèle à estimer les variables de croissance ( $X$  et  $C$ ) sous conditions expérimentales différentes. L'erreur relative moyenne du modèle pour les cultures simulées est de 14 % et de 20% respectivement pour la biomasse sèche et le dénombrement cellulaire.

**Prakash et Srivastava, 2005**

Ce modèle est le plus récent recensé. Il estime la biomasse sèche, la concentration extracellulaire des sucres (glucose), du nitrate et du phosphate pour des suspensions en cuvée et en cuvée alimentées de *Azadirachta indica*. Il estime également la production d'azadirachtine, un composé utilisé comme pesticide naturel.

Le modèle est non structuré et distribué pour la biomasse et la suspension. Le taux de croissance dépend des concentrations extracellulaires et inclus également des termes d'inhibition pour les trois nutriments. L'étude des cinétiques de croissance préalables permettent de déterminer le taux de croissance en fonction de la concentration des nutriments. La figure 2.9 montre ces cinétiques.



**Figure 2-9 :** Cinétiques de croissance de *Azadirachta indica*. (adapté de Prakash et Srivastavs, 2005)

On remarque que les concentrations testées pour le nitrate sont très élevées (de 100 à 350 mM) comparativement aux concentrations normalement retrouvées dans les milieux de culture synthétiques (environ 20 mM). L'inhibition de la croissance par le nitrate ne devrait pas être un problème lors de cultures sous conditions normales. Néanmoins, il est très intéressant d'obtenir ce type de données afin de mieux comprendre le comportement des cellules. L'inhibition par les sucres est également

observée à une concentration au-delà des conditions standards de culture (60 g/L). L'inhibition par le phosphate est quasi linéaire pour des valeurs entre 1 et 4 mM. Les équations suivantes composent le modèle.

$$\mu_X = \mu_{X_{\max}} \left[ \frac{CHO}{CHO + K_{CHO}} \right] \left[ \frac{NO_3}{NO_3 + K_{NO_3}} \right] \left[ \frac{PO_4}{PO_4 + K_{PO_4}} \right] \quad 2-59$$

$$* \left[ \frac{K_{I,CHO}}{K_{I,CHO} + CHO} \right] \left[ \frac{K_{I,NO_3}}{K_{I,NO_3} + NO_3} \right] \left[ \frac{K_{I,PO_4}}{K_{I,PO_4} + PO_4} \right]$$

$$\frac{dP}{dt} = (K_1 \mu_X + K_2) X \quad 2-60$$

$$\frac{dCHO}{dt} = - \left( \frac{1}{Y_{X/CHO}} + \frac{K_1}{Y_{P/CHO}} \right) \frac{dX}{dt} - \left( \frac{K_2}{Y_{P/CHO}} + m_{CHO} \right) X \quad 2-61$$

$$\frac{dNO_3}{dt} = - \left( \frac{\mu_X}{Y_{X/NO_3}} + m_{NO_3} \right) X \quad 2-62$$

$$\frac{dPO_4}{dt} = - \left( \frac{\mu_X}{Y_{X/PO_4}} + m_{PO_4} \right) X \quad 2-63$$

Où  $K_{I,n}$  est la constante d'inhibition du nutriment  $n$ ,  $m_n$  est le taux de maintenance associé à  $n$  et  $P$  est le produit.

Le taux de croissance de la biomasse est décrit par l'équation 2-59. Les trois premiers termes sont des cinétiques de Michaelis-Menten alors que les trois derniers sont les cinétiques d'inhibition. Cette expression du taux de croissance est semblable à celle du modèle de Sirois (équation 2.52).

Le taux de variation des sucres (équation 3-61) est régi par la croissance de la biomasse sèche, la formation de produits et un terme de maintenance qui représente la consommation de sucre non associée à la croissance. Le nitrate et le phosphate sont consommés par la croissance et la maintenance.

Les auteurs ne mentionnent pas combien de cultures furent utilisées pour la détermination des paramètres et présentent les résultats de simulation d'une culture cuvée en bioréacteur de 3 litres. Le modèle est validé par une culture en cuvée alimentée dans le même bioréacteur.

### **3 Matériel et méthodes**

#### **3.1 Lignée cellulaire et maintien**

La lignée cellulaire utilisée lors de ce projet est une suspension de cellules végétales de l'espèce *Catharanthus roseus*. Les stocks de cellule sont entreposés dans des flacons erlenmeyer stériles de 1L contenant 500mL de suspension. Ces derniers sont placés sur un agitateur orbital (Innova 5000, New Brunswick sc.) à 100 rpm dans une pièce à température contrôlée ( $26 \pm 1$  °C). À tous les sept jours, la suspension est sous cultivée en versant la moitié de la suspension uniformément agité dans un nouveau flacon de 1L contenant 250mL de milieu de culture stérile (section 3.2). Les stocks de suspension cellulaire peuvent ainsi être doublés hebdomadairement si nécessaire. Un bouchon de coton stérile est placé sur l'ouverture du flacon afin de maintenir l'intérieur de celui-ci stérile et permettre une aération suffisante. Celui-ci n'est retiré que lors des transferts de suspension sous une hotte à flux laminaire stérile (Envirco, PN62675).

Un échantillon est prélevé dans un flacon choisi au hasard avant et après la sous culture. La biomasse sèche, le dénombrement cellulaire ainsi que la concentration des ions et des sources de carbone sont mesurés. Il est ainsi possible de surveiller l'état des sous cultures et de prévenir un épuisement ou une accumulation des nutriments et des cellules. Les concentrations du milieu de culture sont modifiées au besoin afin de contrôler les conditions de culture. Les données du suivi des sous cultures sont présentées à la figure A.1.

## **3.2 Milieu de culture**

Le milieu de culture utilisé pour les cultures est une version modifiée du milieu de culture standard B5 (Gamborg et al., 1968). Le pH est ajusté à 5.5 avec une solution de KOH à 1M à l'aide d'un pH-mètre (Accumet 805mp). Le milieu est finalement stérilisé à l'autoclave (Steris 3053) pendant 25 minutes à 121°C et 15 psi. La composition du milieu de culture est présentée au tableau A.1.

Lors de la préparation du milieu, la concentration de celui-ci est ajustée afin d'obtenir les concentrations désirées pour l'expérimentation. On considère ainsi le volume de suspension cellulaire ajouté au milieu de culture afin d'obtenir le volume initial de la culture. Le milieu de culture est concentré en conséquence.

## **3.3 Cultures en flacon**

La culture de cellules en flacons est une méthode utile lorsqu'une expérience requiert l'opération de plusieurs cultures simultanément. Les manipulations nécessaires sont moins imposantes que pour une culture en bioréacteur. C'est également une technique plus économique. L'étude des rendements (sections 4.2.2, 4.3.1, 4.3.2 et 4.4.1) est effectuée en flacon de 500 mL alors que pour les cultures utilisés pour la détermination des paramètres du modèle (sections 5.4, 5.5, 5.6 et 5.7) des flacons de 1L sont utilisés. Ces derniers sont inoculés selon la technique de sous culture de la section 3.1 (50% milieu frais, 50% suspension cellulaire). Le milieu de culture est adapté aux besoins de l'expérimentation. Dans le cas des études de rendement, une méthode d'inoculation différente est utilisée.

### 3.3.1 Études et calculs des rendements

Les rendements sont déterminés pour les sources de carbone (glucose, sucrose et fructose), les ions azotés (nitrate et ammonium) et le phosphate. Afin de prévenir l'interférence d'une concentration résiduelle intra ou extracellulaire du nutriment étudié dans le calcul des rendements, la procédure suivante est appliquée.

D'abord, une quantité suffisante de cellules est conditionnée de manière à créer une limitation de croissance par l'épuisement du nutriment. Le nombre de flacons de 1L nécessaire est sous cultivé selon la méthode de la section 3.1 mais le milieu de culture est modifié pour obtenir une concentration du nutriment étudié nulle. Ces cultures sont échantillonnées quotidiennement et lorsque la croissance de la biomasse sèche ou du dénombrement cellulaire plafonne, l'expérience de détermination des rendements débute.

Les cellules sont filtrées sous vide sur miracloth (Calbiochem). À l'aide d'une spatule stérile, des cellules sont alors pesées et déposées dans un flacon contenant 250mL du milieu stérile modifié de manière à obtenir la concentration désirée du nutriment à l'étude (paragraphe suivant). La biomasse humide ajoutée au milieu est établie selon la concentration de biomasse sèche désirée (5 g/L) en utilisant les rapports de biomasse humide/biomasse sèche obtenues pendant le conditionnement. Chaque concentration à l'étude est effectuée en triplicata. Deux des trois flacons sont échantillonnés en alternance. Puisque la durée de l'expérience est inconnue et que le volume de suspension échantillonné peut devenir significativement élevé au fil des jours, cette approche permet d'éviter que le volume de suspension dans les flacons deviennent trop faible.



Les calculs des rendements sont effectués de la manière suivante. Pour le nutriment  $i$  étudié, cinq milieux de cultures sont préparés. Le milieu de base est modifié afin que chacun contienne une concentration différente de  $i$ . Un des milieu en est complètement exempt et sert de référence. Pour une concentration initiale  $[j]_0$ , la biomasse sèche maximale atteinte lors de la culture ( $DW_{i,j,max}$ ) est soustraite à la concentration en biomasse sèche maximale enregistrée dans la culture dépourvue du nutriment  $i$  ( $DW_{i,0,max}$ ). Les mêmes calculs sont effectués pour les rendements cellulaires. Les rendements en biomasse sèche ( $Y_X$ ) et cellulaire ( $Y_C$ ) sont obtenus par :

$$Y_{X,i,j} = \frac{DW_{i,j,MAX} - DW_{i,0,MAX}}{[j]_0} \quad 3.1$$

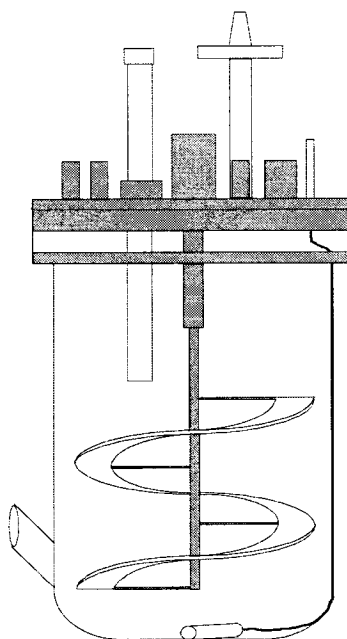
$$Y_{C,i,j} = \frac{C_{i,j,MAX} - C_{i,0,MAX}}{[j]_0} \quad 3.2$$

### 3.4 Cultures en bioréacteur

Les cultures en bioréacteurs sont effectuées dans un système de 4L (volume utile de 3.5 L). La partie principale du bioréacteur est un réservoir cylindrique de verre ouvert sur sa partie supérieure. Un port d'échantillonnage réside à sa base. Un couvercle d'acier inoxydable (SS-316) avec joint d'étanchéité est fixé sur celui-ci avec des brides de manière rendre le contact entre les deux hermétique.

Le couvercle est équipé de six ports. Un pour recevoir une sonde à oxygène dissous (Metler-Toledo, 322756702), deux ports sont utilisés pour l'ajout de solutions de nutriments, un autre sert à l'inoculation par lequel la suspension cellulaire et le milieu de culture est ajouté et les deux autres ports servent d'entrée et de sortie pour les gaz.

Les gaz alimentés (mélange d'air et d'oxygène) sont stérilisés par deux filtres à 0.45 micron (Bacterial air vent, Gelman Sciences) placés en série sur le port d'alimentation des gaz. Un aérateur d'acier inoxydable poreux est fixé au fond du bioréacteur par lequel sont acheminés les gaz d'alimentation. Des micro bulles sont relâchées dans la suspension cellulaire, maximisant le transfert d'oxygène. Le port de sortie des gaz est connecté à une trappe à mousse et ces derniers passent par des filtres stériles de 0.45 microns (Bacterial air vent, Gelman Sciences) avant d'être analysés dans un moniteur de CO<sub>2</sub> ( Rosemount Analytical,880A). L'agitation de la suspension cellulaire est assurée par un ruban hélicoïdal fixé au couvercle par un joint rotatif étanche. Ce type d'agitateur assure une agitation efficace tout en minimisant le taux de cisaillement exercé sur les cellules (Jolicoeur et al., 1992). La rotation de l'agitateur est fixée à 50 rpm avec un moteur électrique (Cole Palmer, 4554-10).



**Figure 3-1 :** Bioréacteur de 4L (Adapté de Galipeau,2004)

### **3.4.1 Préparation et Inoculation**

La sonde à oxygène (Mettler toledo, 322756702) est calibrée après une polarisation de 24 heures. Les points de référence sont obtenus avec de l'eau saturée en oxygène dissous en y faisant buller de l'air (100% OD) et de l'eau à 0% OD dans laquelle bulle de l'azote. Une fois calibrée, la sonde est insérée dans son port situé sur le couvercle. Le bioréacteur est nettoyé à l'eau et le couvercle y est fixé. L'étanchéité est vérifiée en y ajoutant de l'air comprimé. Une jauge à pression est fixée sur un des port et lorsque la pression atteint 15 psi, l'entrée d'air comprimé est fermée. La pression doit être maintenue pendant environ une minute. Par la suite le bioréacteur est stérilisé à l'autoclave (Steris, 3053) pendant 50 minutes à 121°C et 15 psi. Le moniteur à CO<sub>2</sub> (modèle 880A, Rosemount analytical) est calibré avec de l'azote comprimé et un mélange certifié à 8% de CO<sub>2</sub> et 92% d'azote (air liquide).

Le bioréacteur est refroidi à la température ambiante puis la suspension cellulaire et le milieu de culture sont ajoutés par le port d'inoculation. La suspension cellulaire nécessaire est transférée des flacons de 1L au bioréacteur sous une hotte à flux laminaire (Envirco, PN62675) en prenant soin de stériliser les ouvertures à l'aide d'une torche au propane. Le milieu de culture est ensuite ajouté de la même manière. La concentration des nutriments du milieu de culture est ajustée afin d'obtenir les concentrations désirées pour la culture en considérant la dilution de la suspension cellulaire.

### **3.4.2 Contrôle des gaz dissous**

Les concentrations d'oxygène et de dioxyde de carbone dissous dans le bioréacteur sont maintenues respectivement à 120% et 4% par un système de contrôle (Altersis, Virgo).

Le contrôleur utilise les données en ligne d'oxygène dissous et une estimation du gaz carbonique dissous (en utilisant les données en ligne de gaz carbonique dans les gaz de sortie) pour ajuster les débits d'alimentation en air et en oxygène gazeux grâce à des débitmètres (5850E, Brooks instruments) dont la capacité se situe entre 20 et 200 cc/min. La température des bioréacteurs est maintenue par un contrôle de la température ambiante dans le laboratoire à  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ .

### **3.5 Conditions d'opération**

Deux types de culture sont effectués dans le cadre de ce projet. Pour les cultures en cuvée (*batch*), on n'ajoute aucun nutriments en cours de culture. Les cultures effectuées en flacon de 1 litre sont opérées de cette manière. Pour les cultures en bioréacteur, des cuvées alimentées (*fed-batch*) sont réalisées.

#### **3.5.1 Cultures en cuvée**

Les cultures en cuvées se limitent à observer l'évolution de la croissance et la concentration de nutriments. Les seules manipulations nécessaires sont l'inoculation et l'échantillonnage. L'expérience se termine lorsqu'un nutriment est complètement épuisé et que la mortalité cellulaire est perceptible.

#### **3.5.2 Cultures en cuvée alimentée**

Les cultures en cuvée alimentée se déroulent en bioréacteurs. Des nutriments en solution stérilisés à l'autoclave sont ajoutés afin de prévenir un épuisement ou pour maintenir une concentration constante. Avec les données d'échantillonnage, les nutriments nécessaires sont ajoutés ponctuellement à la culture par un port d'ajout en prenant soin de préserver la stérilité de la culture avec des torches à souder. L'ion ammonium est ajouté en continu à l'aide d'une pompe péristaltique (Masterflex, 7503-01) par le biais d'une solution stérile d'ammonium citrate à 45 g/L. On évite ainsi

l'effet toxique d'une augmentation soudaine de la concentration d'ammonium (Sirois, 1997).

Pour les études de cinétique de croissance, le nitrate, l'ammonium, le glucose et/ou le phosphate est ajouté en continue avec une pompe péristaltique afin de maintenir la concentration des nutriments étudiés constante. Les solutions utilisées sont enrichies d'hormones, de vitamines et de micronutriments afin d'éviter toute limitation de croissance non désirée.

### **3.6 Échantillonnage et suivi**

L'échantillonnage des cultures est effectué à des intervalles variant de 24 à 72 heures. Pour chaque échantillon, la concentration de biomasse sèche, le dénombrement cellulaire, la concentration extracellulaire des nutriments et le pH sont déterminés. Il est également possible d'évaluer les concentrations intracellulaires si le contexte de l'expérimentation le nécessite.

Pour les cultures en flacons, les manipulations sont effectuées sous la hotte à flux laminaire (Envirco, PN62675). Le flacon est agité de manière à rendre le mélange cellules/milieu de culture uniforme. Le bouchon de coton est retiré à proximité d'un brûleur bunsen et l'ouverture est immédiatement chauffée. L'ouverture est toujours pointée vers le courant d'air stérile de la hotte et les manipulations sont effectuées de façon à ne pas perturber le flux laminaire entre le flacon et le fond de la hotte. Un échantillon de suspension cellulaire d'environ 30-50 ml est versé dans une bouteille stérile. Un plus grand volume est prélevé si les concentrations intracellulaire sont évaluées.

L'échantillonnage des bioréacteurs est réalisé avec un erlenmeyer de verre stérile muni d'une prise d'air avec filtre stérile de 0.45 microns (Bacterial air vent, Gelman

Sciences). Un bouchon de coton est placé sur l'ouverture de l'erlenmeyer afin de maintenir sa stérilité jusqu'au moment de l'échantillonnage. L'ouverture de l'erlenmeyer correspond à la partie femelle d'un joint de verre poli dont la partie mâle est installée au bout du port d'échantillonnage par le biais d'un tube en silicone. Ce dernier est maintenue étanche avec des pinces Hoffman. Le connecteur mâle est plongé en permanence dans de l'éthanol à 95 %. Le flacon d'éthanol est retiré et l'alcool sur le port d'échantillonnage est enflammé avec une torche au propane. Aussitôt, le bouchon de coton de l'erlenmeyer est retiré et son ouverture est stérilisée à la flamme. Le port d'échantillonnage, toujours enflammé, est inséré dans l'ouverture de l'erlenmeyer. Les pinces Hoffman sont ouvertes et un échantillon d'environ 100 mL est prélevé en relâchant soudainement le tube de silicone. Les pinces sont remplacées, l'erlenmeyer est retiré et le flacon d'alcool est remplacé sur le port d'échantillonnage.

### **3.6.1 Biomasse sèche et humide**

Une bouteille de plastique (Fischer, vial de scintillation 20 mL), un filtre de nitrocellulose à 0.45 micron (Fischer, Millipore) et une cupule en aluminium (Fischer) sont pesés. L'échantillon est agité afin d'uniformiser la suspension prélevée. Celui-ci est versé dans la bouteille. La bouteille pleine est pesée. Le contenu de la bouteille est filtré sous vide et placé dans la cupule. Le poids de la cupule avec la biomasse filtrée est noté puis le tout est séché dans un four à 80°C (Despatch) pendant 24 heures. La cupule avec la biomasse sèche est pesée. La concentration de biomasse sèche et humide de l'échantillon est calculée.

### **3.6.2 Dénombrement cellulaire**

Le dénombrement cellulaire est estimé pour chaque échantillon et exprimé en concentration ( $10^9$  Cellules/ L ou  $10^6$  Cellules/ mL).

Une solution tampon citrate est d'abord préparée en dissolvant 2.1 g d'acide citrique dans 200 mL d'eau distillée. Le pH est ajusté à 4.5 avec du citrate de sodium et 2 g d'EDTA ferrique et 342 g de NaCl sont dissous en agitant vigoureusement.

Une solution enzymatique est préparée avec 200 mL de tampon citrate auquel on dissous 3.2 mL de pectinase et 1 g de cellulase. Les solutions sont conservées au réfrigérateur. La solution enzymatique est remplacée après une semaine.

Un volume de 2 mL de suspension est prélevé de l'échantillon uniformément mélangé et ajouté à 8 mL de tampon citrate et 4 mL de solution enzymatique dans un tube de centrifugation de 15 mL (Fischer). Le tube est placé dans un agitateur pendant 15 minutes (New Brunswick , 676D). Le but de l'utilisation de la solution enzymatique est de minimiser la taille des agrégats cellulaires. Le contenu du tube est agité vigoureusement avec une pipette ajustable de 10 mL (Fischer) afin de détacher autant que possible les cellules des agrégats.

Prélever 100  $\mu$ L de la solution enzymatique contenant les cellules avec une pipette ajustable de 200  $\mu$ L (Fischer) dont l'embout est tronqué afin de permettre le libre passage des cellules. Déposer la goutte sur un pétri et diluer avec 100  $\mu$ L de tampon citrate. Bien mélanger par aspiration à l'aide de la pipette et déposer 100  $\mu$ L dans la chambre de comptage d'un haemocytomètre (Hauser scientific). Placer la lamelle de haemocytomètre sur la chambre de comptage.

L'haemocytomètre est examiné sous microscope (national, DC3-163 digital microscope) à 100X. Si la densité cellulaire est trop élevée, pour assurer un décompte aisé des cellules, les manipulations du précédent paragraphe sont reprises en augmentant la dilution au tampon citrate. L'objectif du microscope est centré sur un carreau de la chambre de comptage dont le volume est de 0.1 mm<sup>3</sup>. Une photo

numérique est sauvegardée sur le disque dur de l'ordinateur relié à l'appareil photo numérique intégré au microscope. Le logiciel d'acquisition d'image utilisé est Motic Image v1.1. Répéter afin d'obtenir la photo de quatre carreaux différents.

Les cellules sont comptées manuellement pour chaque carreau et le compte moyen des 4 photos est calculé (cm). Le dénombrement cellulaire (c) dans la culture est calculé en tenant compte de la dilution (D) des échantillons comptés qui se situe entre 4 et 20.

$$c = cm * D * \frac{1}{0.1mm^3} * 10^6 \frac{mm^3}{L} [=] \frac{cellules}{L} \quad 3.3$$

### 3.6.3 pH

Du milieu de culture est prélevé de l'échantillon et le pH est mesuré avec un pHmètre (Accumet 805mp).

### 3.6.4 Concentration des nutriments extracellulaires

Un volume de 2 mL de l'échantillon est filtré dans un vial pour HPLC (Kimble glass, Fischer) à l'aide d'une seringue muni d'un filtre 0.45 micron (Fischer). Cet échantillon est utilisé pour déterminer la concentration des anions, des cations et des glucides en solution par chromatographie (section 4.7).



### 3.6.5 Concentration des nutriments extracellulaires

Une partie de l'échantillon est filtrée sur miracloth (Calbiochem) afin de prélever environ 1.5 g de biomasse humide. Celle-ci est plongée dans l'azote liquide afin d'arrêter l'activité des enzymes intracellulaires. La biomasse peut être entreposée au congélateur à -20°C. L'échantillon congelé est broyé en une fine poudre avec un pilon et un mortier (Coortek, 60316) préalablement refroidis à l'azote liquide. La poudre est pesée et déposée dans un tube de centrifugation de 15 mL (Fischer) auquel 8 mL d'eau distillée sont ajoutés. Le tube est agité pendant une heure (New Brunswick, 676D) puis le liquide est filtré à la seringue muni d'un filtre à 0.45 micron (Fischer) dans un vial pour HPLC (Kimble glass, Fischer). Les nutriments intracellulaires extraits sont quantifiés par chromatographie (section 4.7). Les concentrations intracellulaires sont calculées sur une base de biomasse sèche ou de nombre de cellule avec les rapports WW/DW et cellules/gDW.

## 3.7 Méthodes analytiques

La concentration des anions ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ), des cations ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ) et des sources de carbone (sucrose, glucose, fructose) est déterminée par chromatographie liquide à haute performance (HPLC)

### 3.7.1 Ions

Le détecteur utilisé est de type électrochimique et est opéré en mode conductivité (Dionex). Une pompe (Dionex) et un injecteur automatique (Spectra System, 3500) complète l'appareil. Le logiciel d'acquisition des données est le Peaknet 5.2 (Dionex) et il sert au contrôle du HPLC.

Une colonne 4x250 mm (IONPAC Dionex, AS4A-SC) et un suppresseur cationique (Dionex, ASRS-1) sont utilisés pour séparer les cations. La phase mobile est une solution aqueuse de bicarbonate (35 mM  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  et 1.0 mM de  $\text{NaHCO}_3$ ) alimentée à 1.0 mL/min. Les anions sont séparés par une colonne 4 x 250 mm (Dionex, IONPAC CS-12) et par un suppresseur anionique (Dionex, CSRS-1). La phase mobile est une solution aqueuse d'acide méthanosulfonique (20 mM) alimentée à 0.9 mL/min.

### **3.7.2 Glucides**

La séparation des glucides est réalisée par une colonne de séparation (Biorad, Aminex HPX87C) maintenue à une température constante de  $80^\circ\text{C} \pm 3$ . Le système comporte aussi une pompe volumétrique (Waters, 501.), un injecteur automatique (Gilson, 231/401), un réfractomètre (ERC inc., 7515-A), un élément chauffant (ManTech, 7980) et un logiciel d'acquisition des données (Dionex, Peaknet 5.3). Le volume de milieu injecté est de 20  $\mu\text{L}$  et la phase mobile (eau distillée filtrée) est alimentée à un débit de 0.25 mL/min.

Le temps d'analyse disponible sur les HPLC est utilisé en priorité pour la mesure des ions. Habituellement, les échantillons sont accumulés et les analyses de sucres sont effectuées la nuit ou les fins de semaine. Le glucose en solution peut cependant être mesuré rapidement en utilisant un glucomètre (Boehringer Mannheim, Accutrend Instant) communément utilisé par les diabétiques pour la lecture des valeurs glycémiques. Le milieu extracellulaire est dilué afin d'obtenir une concentration dans les limites de l'appareil. Cette alternative est particulièrement utile pour l'étude des cinétiques de croissance des sources de carbone puisqu'une mesure est requise quotidiennement afin de maintenir la concentration constante.

### 3.8 Calculs des taux de croissance

Les mesures de la biomasse sèche et particulièrement celle du dénombrement cellulaire sont sujettes à des facteurs pouvant rendre l'erreur expérimentale considérable. En effet, l'uniformité de la suspension recueillie et les manipulations effectuées pour la préparation de l'échantillon sont des sources d'erreur potentielles. Malgré un protocole bien établi, le dénombrement est toujours sujet à une certaine subjectivité lors de l'étape du compte manuel des photos. La distinction entre un débris et une cellule viable n'est pas toujours évidente et l'interprétation varie d'une personne à l'autre. De plus, la présence d'agrégats de cellules subsiste parfois malgré le traitement à la solution enzymatique. Le décompte devient alors très difficile puisqu'il est impossible de distinguer les cellules individuelles.

Toutes ces causes d'erreurs entraînent une irrégularité des profils de croissance qui font que le calcul des taux de croissance est mathématiquement très sensible aux erreurs de mesure. Afin de minimiser l'impact de cette erreur sur les taux de croissance, la moyenne de trois taux de croissance est calculée. Au temps  $t$ , le taux de croissance moyen est calculé ainsi :

$$\mu_{t-1} = \frac{\ln\left(\frac{x_t}{x_{t-1}}\right)}{\Delta t} \quad 3.4$$

$$\mu_t = \frac{\ln\left(\frac{x_{t+1}}{x_{t-1}}\right)}{2\Delta t} \quad 3.5$$

$$\mu_{t+1} = \frac{\ln\left(x_{t+1}/x_t\right)}{\Delta t} \quad 3.6$$

$$\overline{\mu}_t = \frac{\mu_{t-1} + \mu_t + \mu_{t+1}}{3} \quad 3.7$$

## **4 Caractérisation de la croissance de *C. roseus***

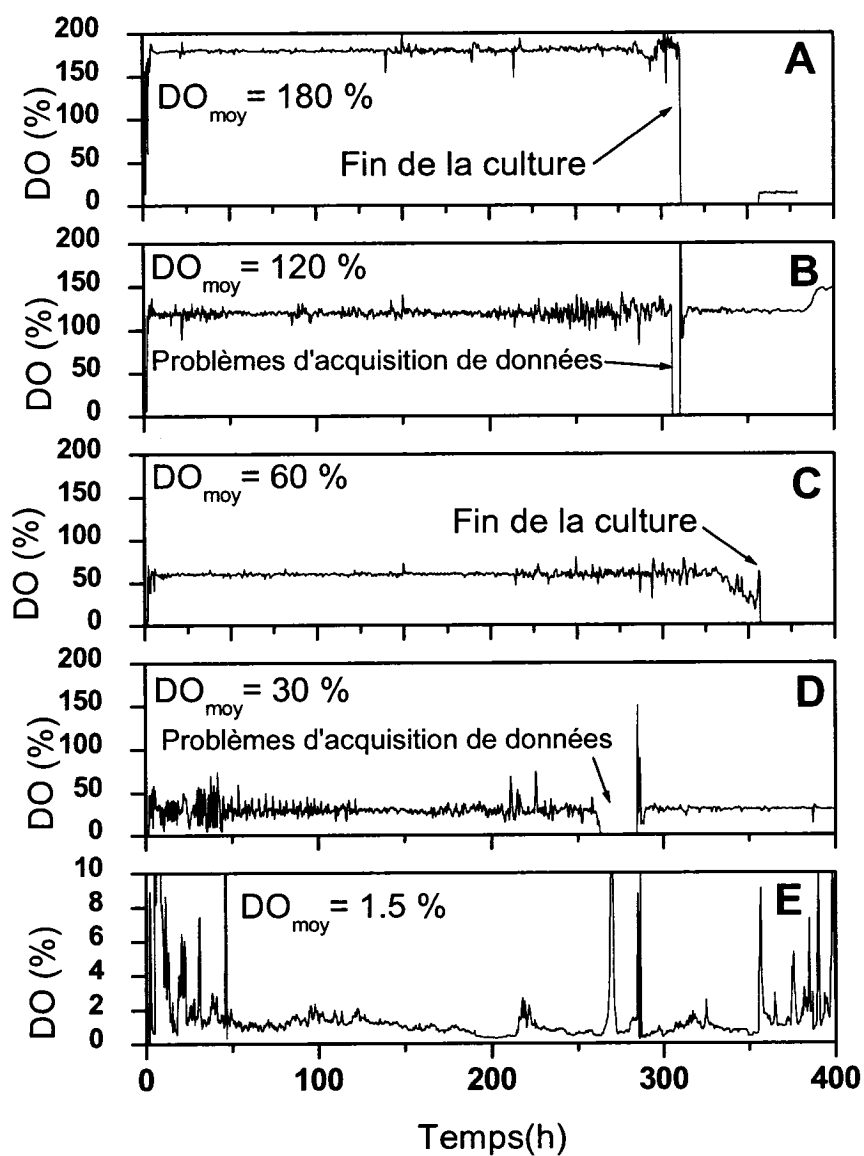
Afin de mieux connaître l'effet des conditions de culture sur la croissance et la prolifération cellulaire, différentes expérimentations sont effectuées. Les nutriments qui sont réputés avoir le plus grand impact sur la croissance sont étudiés soit l'oxygène dissous, les sources de carbone, d'azote et de phosphate.

Ainsi, pour l'oxygène dissous, la croissance et la prolifération sont observées à différentes concentrations afin de déterminer si une plage est limitante. Pour les nutriments, les rendements sont déterminés pour définir les besoins nutritionnels associés à la division cellulaire et à la croissance de la biomasse sèche. La vitesse de la croissance en fonction de la concentration des nutriments est également investiguée pour déterminer des cinétiques de croissance.

Cette étude de l'impact des conditions de culture des cellules a pour but premier d'obtenir de l'information qui servira à la modélisation. Les résultats obtenus sont utilisés lors du développement du modèle exposé à la section 5.

## **4.1 Effet de l'oxygène dissous**

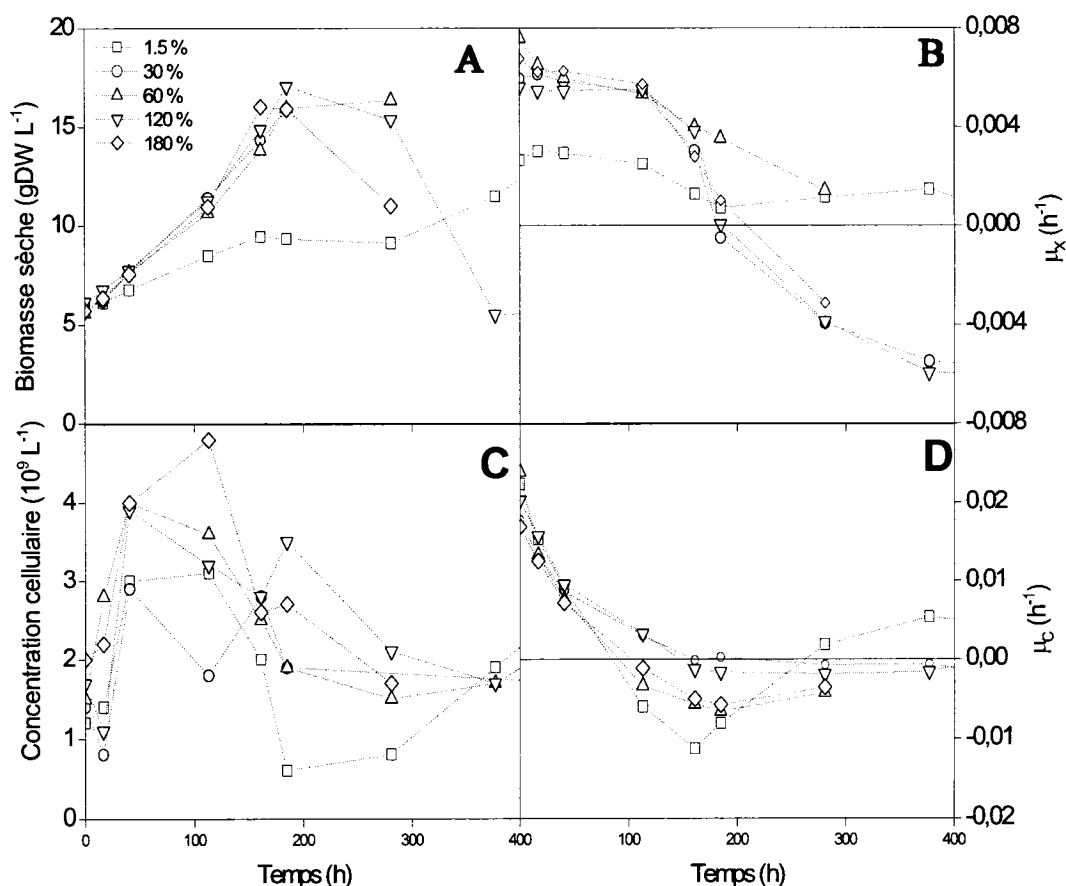
Bien que l'oxygène dissous ne soit pas un paramètre considéré dans le modèle de croissance proposé, une étude est effectuée afin de déterminer les plages de concentration qui limitent la croissance. Ainsi, on pourra effectuer les expériences subséquentes en évitant une limitation de croissance due à l'oxygène dissous. Cinq bioréacteurs en cuvée alimentée sont utilisés pour cette étude. La concentration est maintenue constante pour la durée des cultures. Les concentrations testées sont 1.5%, 30%, 60%, 120% et 180% d'oxygène dissous. La biomasse sèche initiale est de  $6 \pm 1$  g/L. Les nutriments sont ajoutés ponctuellement afin d'éviter toute limitation nutritionnelle en ions ou en sucres. La figure 4.1 montre les profils d'oxygène dissous dans les bioréacteurs au cours des cultures.



**Figure 4-1 :** Concentration de l'oxygène dissous dans cinq bioréacteurs.

Le système d'acquisition de données est parfois défaillant et pendant des laps de temps variables, les données sont perdues. Ce problème est observé dans les cultures à 120% et 30% de DO. Ce phénomène n'affecte pas la qualité du contrôle et les concentrations d'oxygène dissous durant ces défaillances ne sont pas nulles comme l'indique la figure. Le contrôle des bioréacteurs à 1.5% et 30% est plus difficile. On observe une lecture

d'oxygène dissous plus bruitée pour ces deux cultures. La difficulté vient du fait que le débit d'oxygène demandé dans ces cultures est plus faible que le débit minimal pouvant être fourni par le débitmètre. Le système de contrôle a donc tendance faire osciller le débitmètre entre l'état ouvert et fermé. On remarque que pour la culture à 30%, la lecture se stabilise vers 125 heures, alors que la demande en oxygène sollicite un plus grand débit. La figure 4.2 présente les profils de biomasse sèche et de dénombrement cellulaire des cinq cultures en bioréacteurs. Les taux de croissance de ces deux paramètres sont également présentés. Les données brutes des cultures sont disponibles à l'annexe B.



**Figure 4-2 :** Effet de l'oxygène dissous sur les taux de croissance. A- Profils de biomasse sèche, B- Taux de croissance de la biomasse sèche, C- Profils de concentration cellulaire, D- taux de prolifération cellulaire.



En observant les profils de biomasse sèche, on remarque que le bioréacteur maintenu à 1.5% d'oxygène dissous présente une limitation de croissance évidente comparativement aux autres. Pendant la croissance exponentielle, entre 0 et 100 heures, ce dernier a un taux d'environ  $0.002 \text{ h}^{-1}$  (figure B) alors que les quatre autres sont à environ  $0.005 \text{ h}^{-1}$ . Ces résultats suggèrent que l'oxygène dissous doit être maintenue à au moins 30% afin d'éviter toute limitation de croissance de la biomasse sèche.

L'interprétation des profils de dénombrement cellulaire n'est pas aussi évidente que la biomasse sèche. Les taux de croissances présentés en 4.2D montrent que les taux de croissance sont comparables en début de culture. À 100 h., les taux de croissance deviennent négatifs, indiquant un taux de mortalité important pour toutes les cultures. On ne peut conclure à une limitation de la croissance du dénombrement cellulaire pour les concentrations en oxygène dissous étudiées.

À la lumière de cette expérience, la concentration en oxygène dissous des cultures en bioréacteurs doit être maintenue à au moins 30% afin d'éviter une limitation de la croissance en biomasse sèche. Le système de bioréacteur utilisé est généralement réglé à une concentration en oxygène dissous de 120% pour plusieurs espèces. Cette valeur présente les meilleures conditions afin d'assurer un contrôle aisé de l'oxygène dissous et sollicite la plupart du temps un débit supérieur à la limite inférieure des débitmètres. Ainsi, pour toutes les expériences effectuées en bioréacteur à venir dans ce mémoire, l'oxygène dissous est maintenue à 120%.

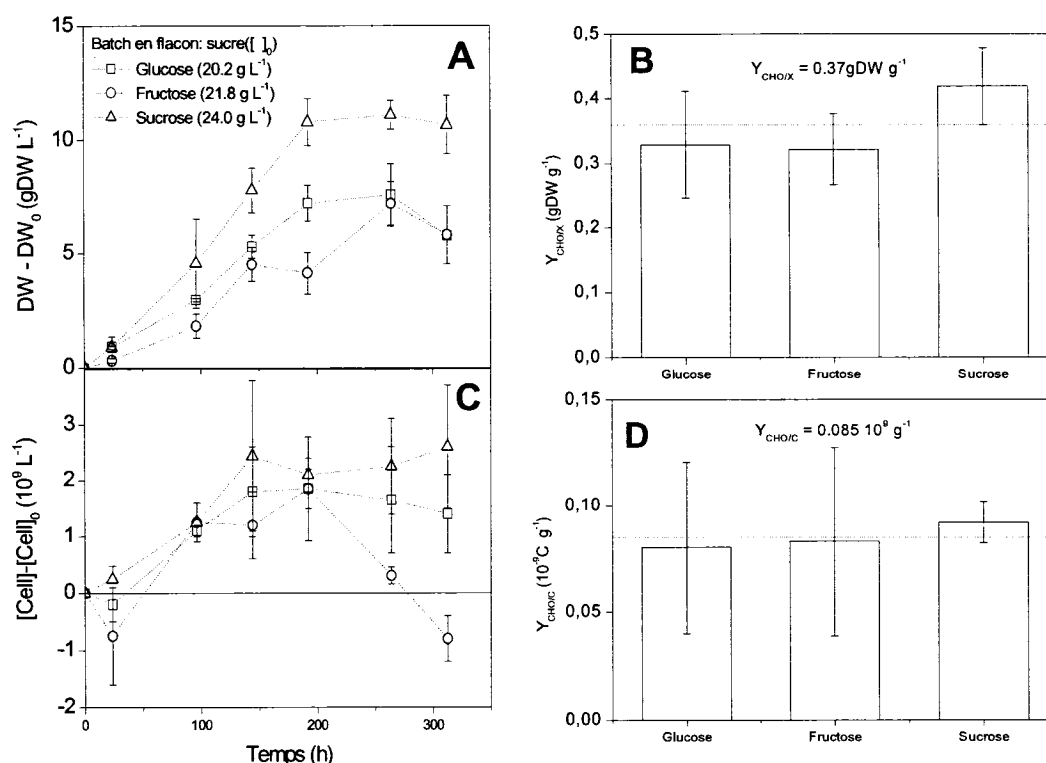
## **4.2 Effet des sources de carbone**

Une source de carbone externe doit être fournie aux suspensions de cellules végétales hétérotrophes. Des sucres simples comme le sucrose et le glucose sont ajoutés dans le

milieu de culture. Ces sucres sont absorbés par les cellules du milieu de culture et ensuite métabolisés pour la respiration, la formation de biomasse et la formation de divers métabolites.

#### **4.2.1 Croissance selon la source de carbone**

Afin de déterminer si la nature du sucre fourni aux cellules de *C. roseus* a un impact sur la croissance et la prolifération cellulaire, une expérience en flacon de 1 litre est effectuée. Les sucres étudiés sont le sucrose, le glucose et le fructose. Les cellules sont d'abord sous cultivées selon la méthode exposée à la section 4.1 pendant un mois. Trois lignées sont ainsi produites. La seule différence étant la source de carbone fournie lors des sous cultures soit environ 20 g/L de sucrose, de glucose ou de fructose. Après quatre sous cultures (4 semaines), la croissance est observée pour chacune des sources de carbone. Le délai de quatre sous cultures a pour but de donner le temps au métabolisme des cellules de s'adapter à la source de carbone fournie. Les expériences sont effectuées en duplicata dans des flacons de 500 ml.



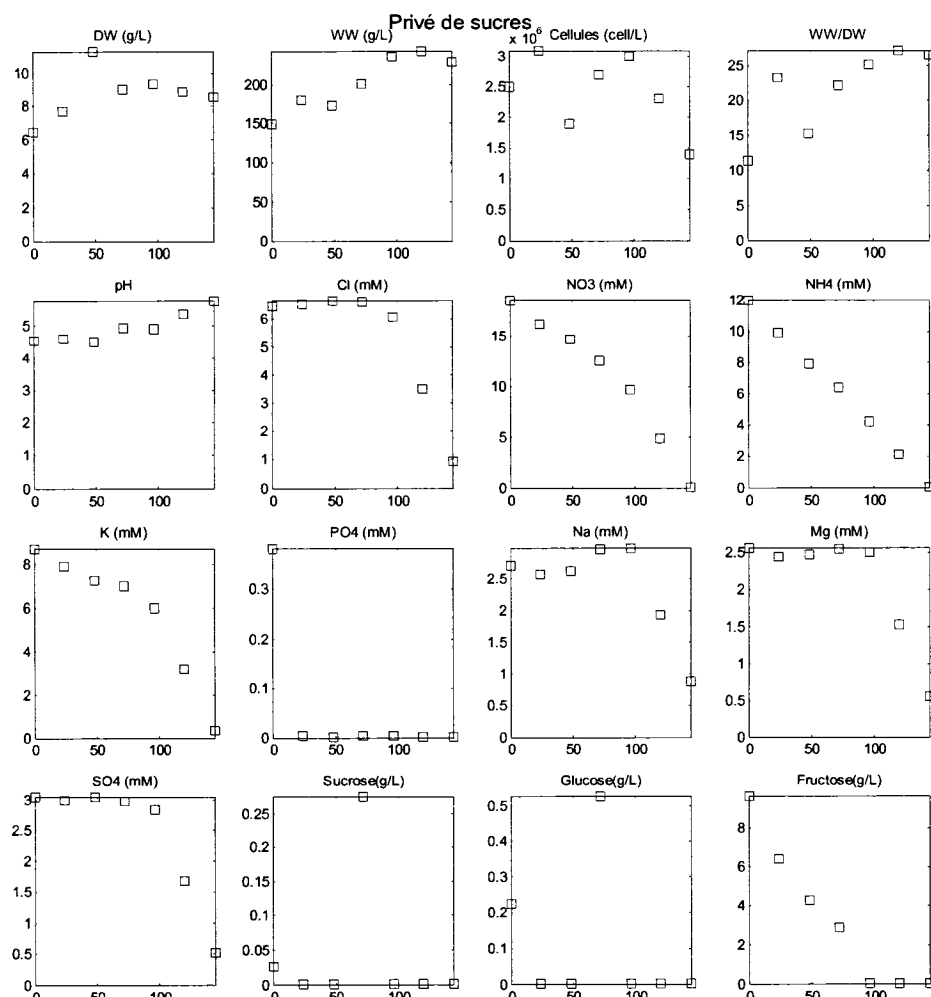
**Figure 4-3 :** Croissance et rendements en fonction de la source de carbone. A- Profils de biomasse sèche, B- Rendements en biomasse sèche calculés, C- Profils de concentration cellulaire, D- Rendements en cellules calculés.

La concentration visée à l'inoculation pour les trois glucides était de 20 g/L. Les valeurs mesurées par les premiers échantillons sont respectivement de 20.2, 21.8 et 24.0 g/L pour le glucose, le fructose et le sucrose. Les rendements obtenus en biomasse sèche et en nombre de cellules, en considérant les barres d'erreurs, sont comparables pour les trois sucres avec des moyennes de 0.37 gDW/g et 0.085x10<sup>9</sup> cellules/g. Des expérimentations avec des cellules de fèves de soya ont également démontrées la capacité des cellules à utiliser ces trois sucres avec des rendements identiques (Yen et al. 1999). Bien que la croissance des suspensions dans cette publication soient basées sur le volume cellulaire et non la biomasse sèche, les auteurs concluent que le rendement est identique pour les trois sources de carbone.

### 4.2.2 Rendements

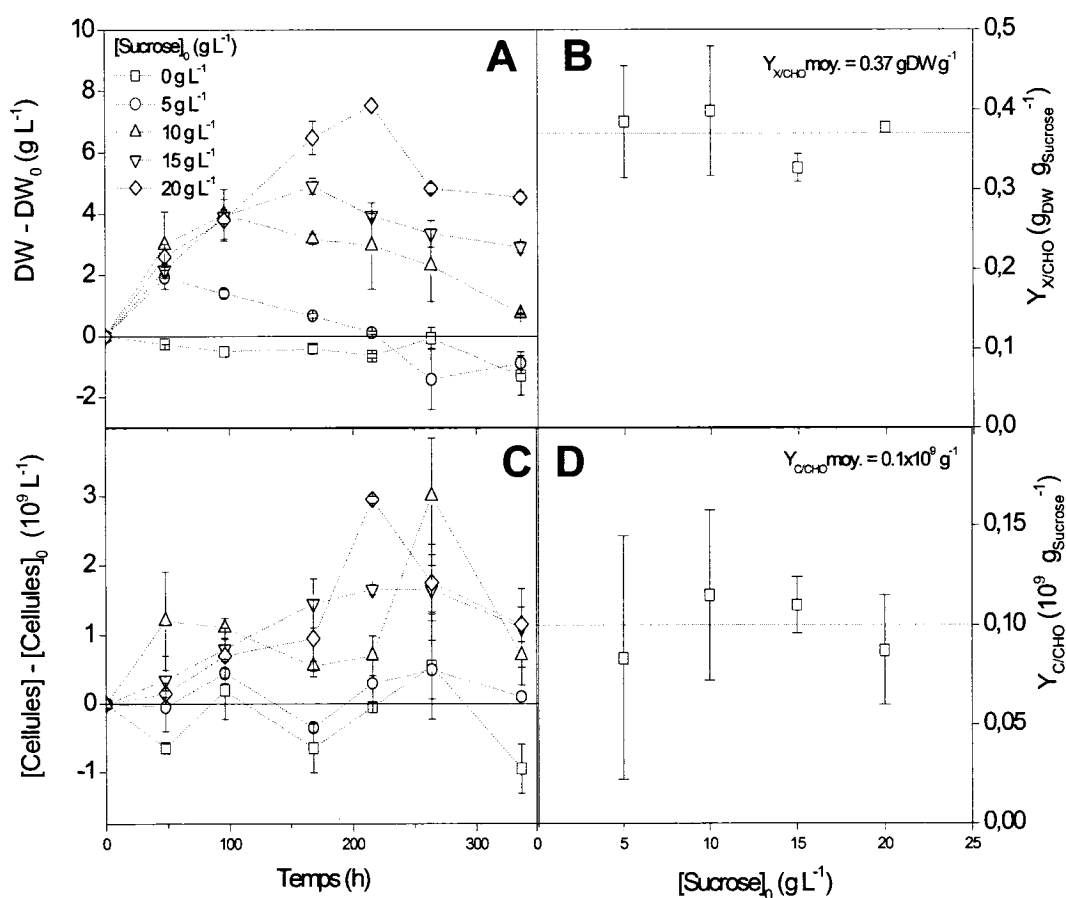
Le sucrose est utilisé pour déterminer de façon plus rigoureuse les rendements en source de carbone. La méthode utilisée est telle que décrite à la section 3.3.1. Les résultats sont présentés de façon à montrer la biomasse sèche et le nombre de cellules générées. L'axe des ordonnées des figures 4-5A et 4-5C est la soustraction de la biomasse sèche ou du nombre de cellules à sa valeur à l'inoculation. Ainsi, la croissance peut être appréciée sur une base d'accroissement de la biomasse ou du dénombrement cellulaire. Il est ainsi possible de faire la moyenne des triplicatas. Bien que les mêmes valeurs de biomasse sèche à l'inoculation étaient visées, la technique a tout de même engendrée une certaine variabilité (de 3 à 5 gDW/L). La technique de filtration a pour désavantage de produire un gâteau de cellules qui demeure plus humide sur le dessus. Afin de minimiser cet effet, des gâteaux de cellules plus minces devraient être filtrés afin de drainer les cellules uniformément.

Pour déterminer les rendements le plus précisément possible, les cellules utilisées sont d'abord sous cultivées dans un milieu dépourvu de sucres. La suspension est échantillonnée quotidiennement jusqu'à ce que toute croissance soit interrompue. On élimine ainsi les résidus de sucre encore présents dans les milieux intra et extracellulaires. La figure 4.4 montre que la seule source de sucre disponible au début de ce conditionnement est le fructose. Vers 100h, toutes les sources de carbone extracellulaires sont épuisées. Les profils de biomasse sèche et de dénombrement cellulaire sont en phase stationnaire, indiquant une limitation de croissance par la source de carbone. On remarque que la biomasse sèche augmente d'environ 3 gDW/L pour 9 g/L de fructose, soit un rendement de 0.33 gDW/g, valeur proche de celle obtenue à la section 4.2.1 (0.37 gDW/g).



**Figure 4-4 :** Suspension privée de sucres.

Quatre concentrations initiales de sucrose sont étudiées (5, 10, 15 et 20 g/L) pour obtenir les rendements. On effectue également un contrôle avec un milieu dépourvu de sucrose. La figure 4.5 présente les profils de biomasse sèche et de concentration cellulaire obtenus ainsi que les rendements pour chaque concentration initiale.



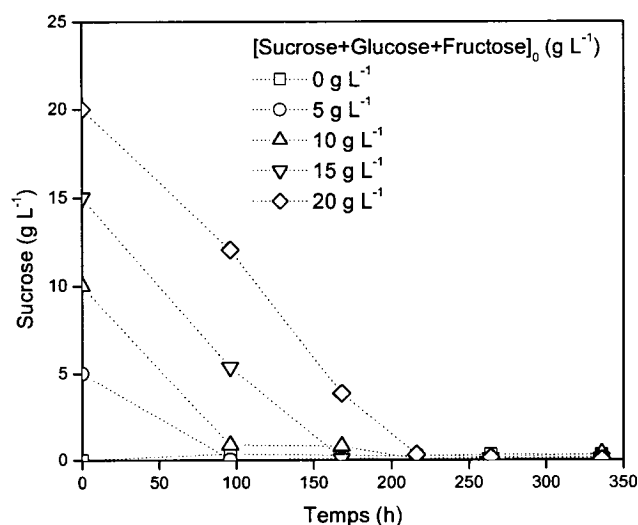
**Figure 4-5 :** Rendements en source de carbone. A- Profils de biomasse sèche, B- Rendements en biomasse sèche en fonction de la concentration initiale de sucrose, C- Profils de concentration cellulaire, D- Rendements en cellules en fonction de la concentration initiale de sucrose.

La croissance en biomasse selon la quantité de sucrose fournie permet de déterminer un rendement moyen de  $0.37 g_{DW}/g$ . Cette valeur confirme celle obtenue à la section 4.2.1 et est similaire à celle obtenue pour *E. californica* ( $0.3 g_{DW}/g$ -Sirois, 2000). La culture sans sucrose ne génère aucune biomasse, prouvant que les réserves intracellulaires de sucres étaient épuisées.

La prolifération cellulaire permet également de confirmer le rendement en cellules de la section 4.2.1. Le rendement moyen obtenu est de  $0.1 \times 10^9$  cellules/g. On remarque

une variabilité plus grande dans les mesures de concentration cellulaire. Ceci s'explique par la technique de compte cellulaire qui induit une erreur de mesure plus importante. De plus, l'erreur sur les rendements est d'autant plus élevée à faible concentration par la nature du calcul de rendement. Le rapport de la concentration cellulaire par la concentration initiale est particulièrement sensible à faibles concentrations. L'erreur sur les rendements décroît en fonction de la concentration initiale en sucrose.

La biomasse plafonne chronologiquement selon la quantité de sucrose fournie. Cet arrêt de la croissance coïncide avec l'épuisement des sucres extracellulaires tel que présenté à la figure 4.6. (50h pour 5g/L, 100h pour 10g/L, 175h pour 15 g/L et 215h pour 20g/L). Le plafonnement de la biomasse de la culture avec 5 g/L se produit à environ 50h mais l'échantillonnage n'est effectué qu'à 0h et 100h. On peut extrapoler l'épuisement des sucres extracellulaires à environ 50h en utilisant la pente initiale des autres cultures.



**Figure 4-6 :** Sucres totaux (sucrose, glucose et fructose) des cultures de rendements en source de carbone.

### 4.2.3 Cinétique de croissance

Afin de vérifier si la vitesse de la croissance est influencée par la concentration extracellulaire de la source de carbone, une expérience en bioréacteurs est menée selon la technique décrite à la section 3.5.2. Les concentrations extracellulaires de glucose sont maintenues constantes dans trois bioréacteurs (60 g/L, 30g/L et 5 g/L en moyenne, voir figure 4.7) au moyen d'ajouts en continu d'une solution concentrée de glucose.

Le glucose est préféré aux autres sources de carbone pour des raisons pratiques. Afin de maintenir une concentration de sucre constante, il est nécessaire d'ajuster régulièrement le débit des pompes péristaltiques qui alimentent le réacteur. Contrairement aux autres sucres, le glucose peut être analysé rapidement avec un glucomètre. À l'aide de cette technique, le débit des pompes fournissant le glucose peut être ajustés deux fois par jour, permettant un contrôle plus précis des concentrations. De plus, le glucomètre permet d'échantillonner pendant les fins de semaine lorsque les HPLC ne sont pas disponibles. Les rendements identiques pour les trois sucres obtenus à la section 4.2.2 justifient la généralisation des cinétiques de cette étude au fructose et au sucrose. On pose l'hypothèse que les taux de croissances sont indépendants de la source de carbone utilisée.

La solution d'alimentation du bioréacteur en glucose contient 600 g/L de glucose. Afin de prévenir des limitations de croissance dues à l'épuisement des composés non mesurés durant la croissance, cette solution est enrichie d'hormones, de vitamines et de micronutriments. Le tableau 4.1 détaille sa composition.

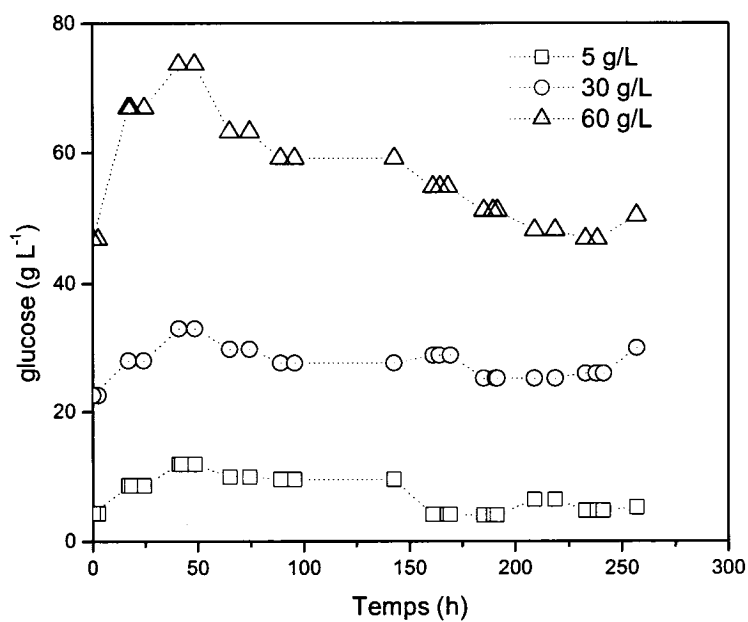


**Tableau 4-1:** Composition de la solution d'ajout de glucose

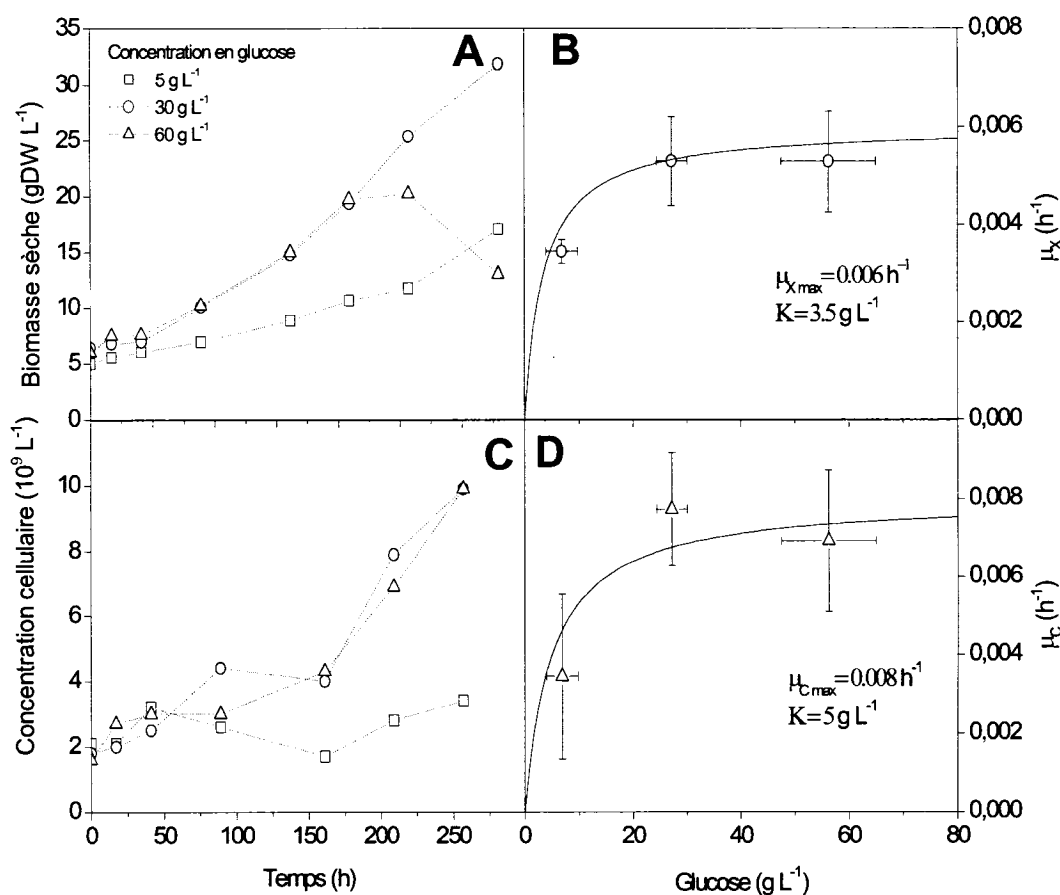
Concentration dans la solution	
glucose	600 g/L
2,4-D	1 mg/L
Kinétine	0.1 mg/L
Micronutriments	5 X le milieu standard*
Vitamines	5 X le milieu standard*

\*Voir l'annexe A.

Les profils de concentration en glucose dans les trois bioréacteurs sont présentés à la figure 4.7. Les concentrations ont été maintenues relativement constantes pour la durée des cultures.

**Figure 4-7 :** Concentration en glucose des bioréacteurs de la cinétique de croissance.

La figure 4.8 montre les profils de biomasse sèche (4.8A) et du dénombrement cellulaire (4.8C) pour les trois bioréacteurs. Les taux de croissance moyens en fonction de la concentration en glucose pour les deux paramètres sont également présentés (4.8B et 4.8D). Les données brutes de ces cultures sont présentées à l'annexe C.



**Figure 4-8 :** Cinétique de croissance en fonction de la concentration en glucose. A- Profils de biomasse sèche, B- Taux de croissance de la biomasse sèche en fonction de la concentration de glucose, C- Profils de concentration cellulaire, D- Taux de prolifération cellulaire en fonction de la concentration de glucose.

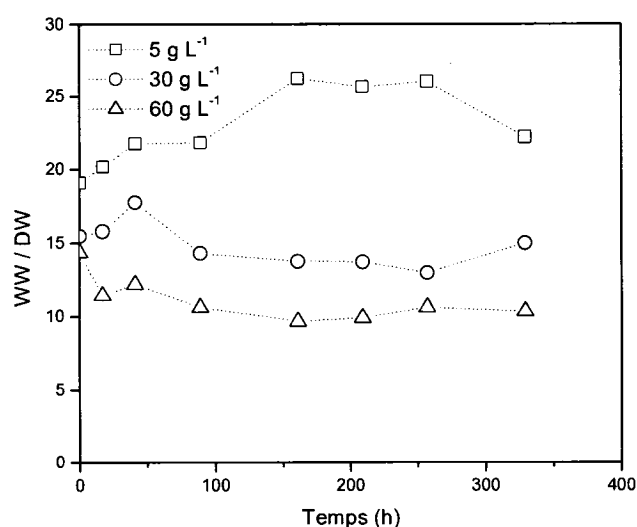
On remarque que les profils de DW et C (figure 4.8A et 4.8C) sont comparables pour une concentration moyenne de 30 et 60 g/L. Cependant, lorsque la concentration est

maintenue à 5 g/L, les taux de croissance sont plus lents. Ces résultats suggèrent une cinétique des taux de croissance en fonction de la concentration de glucose qui suit une cinétique de Michaelis-Menten. Les paramètres pour la croissance en biomasse sèche sont  $K_m=3.5\text{g/L}$  et  $\mu_{\max}=0.006$ . Pour la prolifération cellulaire, ils sont de  $K_m=5\text{ g/L}$  et  $\mu_{\max}=0.008$ . Les valeurs de  $K_m$  sont estimées manuellement et serviront de conditions initiales lors de la détermination des paramètres par simulations numériques à la section 5.7.

L'expérience c'est terminé malgré le fait que les suspensions étaient toujours en croissance pour des raisons techniques. Vers la fin des cultures, les débitmètres étaient à capacité maximale (200 cc / min) dans les cultures à 30 et 60 g/L de glucose. Les niveaux d'oxygène dissous ne pouvait plus être maintenus, la limite du système étant atteinte. De plus, la densité des suspensions était telle que le mélange de la suspension n'était pas uniforme. La biomasse humide maximale observée fut dans le réacteur avec 30 g/L de glucose avec 478 gWW/L. À une telle densité cellulaire, des quantités importantes de cellules s'accumulent dans la tête du réacteur sous l'action du ruban hélicoïdale. On peut supposer que les taux de croissance auraient été plus élevés si l'accumulation en tête de bioréacteur avait été évitée. La densité des cultures rendait également difficile un échantillonnage uniforme, expliquant partiellement les deux dernières mesures de biomasse sèche du réacteur à 60 g/L de glucose.

Cette expérience permet également d'observer une influence de la concentration de glucose sur le contenu en eau et donc sur le volume cellulaire. La figure 4.9 montre le rapport de la biomasse humide sur la biomasse sèche des trois bioréacteurs. Plus la concentration en glucose est élevée, plus le contenu en eau des cellules est faible. Ce phénomène peut être attribué à la pression osmotique qu'exerce le glucose en solution sur les cellules. Le transfert de la suspension dans un milieu de culture à haute concentration de glucides peut engendrer un choc osmotique important au niveau cellulaire. Les effets observés d'un tel stress sur une suspension de *Ipomoea batatas*

(Wang et al., 1999) sont un prolongement de la phase de latence, une réduction de la taille des cellules et une augmentation de l'accumulation des acides aminés intracellulaires (alanine et acide glutamique) et de l'amidon. Toujours selon la même étude, des sous cultures répétées dans un milieu de culture à haute pression osmotique (0.6 M de sorbitol) permettent aux cellules de s'adapter et de réduire significativement la durée de la phase de latence. Dans le cas présent, la période de latence n'est pas plus longue pour la culture avec 60 g/L de glucose.



**Figure 4-9 :** Effet du glucose sur le rapport biomasse humide / biomasse sèche.

### 4.3 Effet des sources d'azote

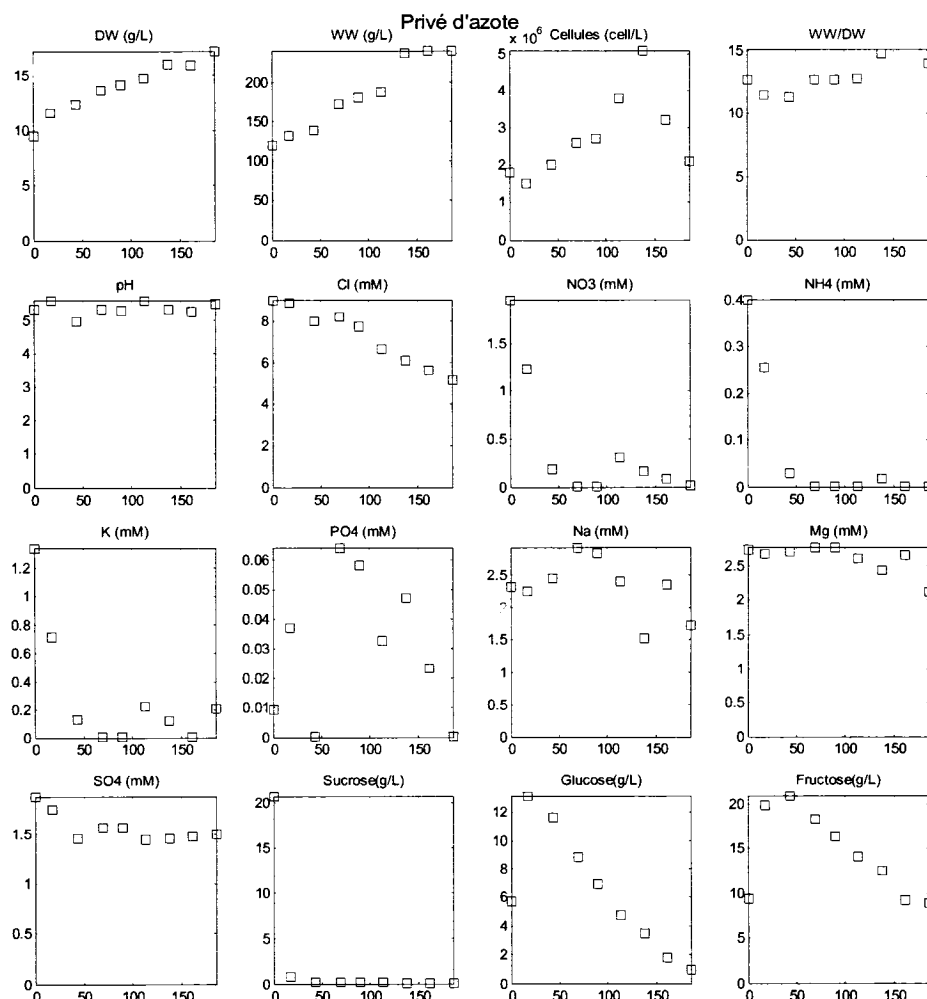
L'azote est un élément essentiel à la croissance des végétaux. Les plantes puisent leur sources d'azote principalement des ions nitrates et dans une moindre mesure de l'ammonium disponible dans le sol. La source d'azote de la plupart des milieux de culture synthétiques utilisés en culture de suspensions cellulaires végétales est constituée de ces deux ions. L'impact de ces ions sur la croissance est étudié dans cette section.

D'abord les rendements en biomasse et en prolifération cellulaire des deux ions sont déterminés. Un stock de cellules est conditionné en sous cultivant dans un milieu dépourvu d'azote. Lorsque la croissance cesse, ces cellules sont utilisées pour déterminer les rendements en azote et en nitrate.

La vitesse de croissance est déterminée en fonction de la concentration extracellulaire d'azote. La concentration en ammonium et en nitrate est maintenue à des niveaux différents dans cinq bioréacteurs.

#### **4.3.1 Rendements en Nitrate**

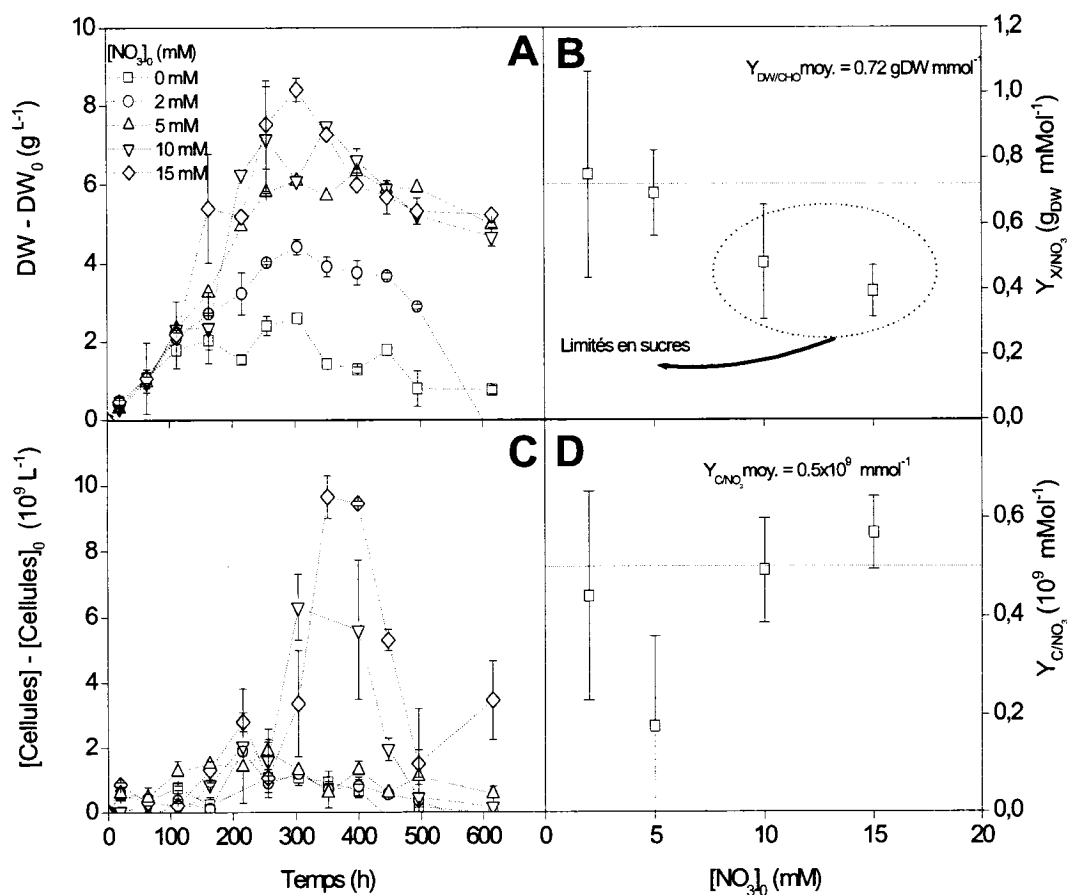
Les rendements sont déterminés par la méthode exposée à la section 3.3.1. La biomasse et le nombre de cellules générés sont utilisés à l'axe des ordonnées des figures 4.11A et 4.11C. La figure 4.10 montre les données bruts du conditionnement sans azote.



**Figure 4-10:** Suspension privée d'azote.

Le conditionnement préalable des cellules permet d'apprécier l'effet d'une privation d'azote sur la croissance. Les ions azotés extracellulaires sont épuisés à 50 heures. La biomasse et le dénombrement cellulaire continuent cependant de croître jusqu'à environ 130 heures. La croissance entre 50 et 130 heures est assurée par les réserves intracellulaires d'azote. Au delà de 130 heures, la concentration en cellules décroît rapidement (figure 4.10).

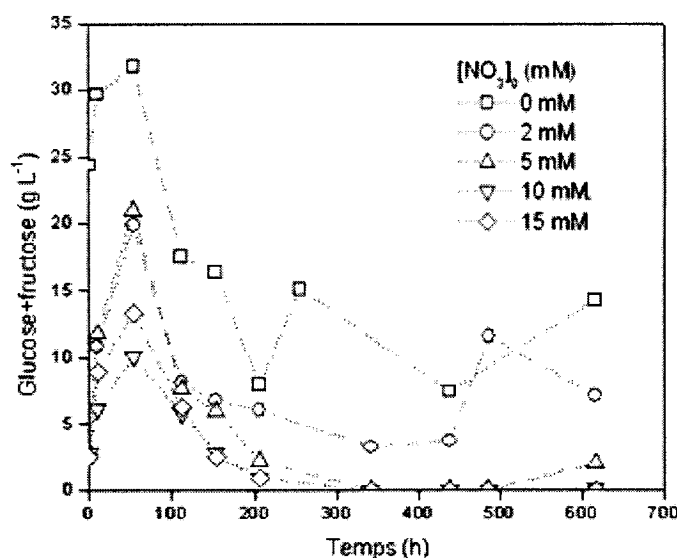
L'étude des rendements en nitrate est présentée à la figure 4.11. On remarque que malgré une privation d'azote préalable de 200 heures, il y a tout de même un accroissement en biomasse (2.5 g/L) et en cellules ( $1 \times 10^9$ /L) pour la culture sans azote. Afin de déterminer le rendement réel en azote, on soustrait de la biomasse et des cellules générées celles de la culture sans azote.



**Figure 4-11:** Rendements en nitrate. A- Profils de biomasse sèche, B- Rendements en biomasse sèche en fonction de la concentration initiale de nitrate C- Profils de concentration cellulaire, D- Rendements en cellules en fonction de la concentration initiale de nitrate.

Les profils de biomasse sèche (4.11A) plafonnent de plus en plus haut à mesure que la quantité initiale de nitrate augmente. Cependant, en comparant les cultures avec 5, 10

et 15 mM, on observe que la biomasse générée est sensiblement la même. Conséquemment, les rendements obtenus pour 2 et 5 mM sont comparables (0.72 gDW/mmol) alors qu'ils diminuent graduellement à 10 mM (0.5 gDW/mmol) et 15 mM (0.4 gDW/mmol). Cette diminution du rendement indique qu'une limitation autre que le nitrate est venue interrompre la croissance.



**Figure 4-12 :** Sources de carbone extracellulaires des cultures de rendements en nitrate.

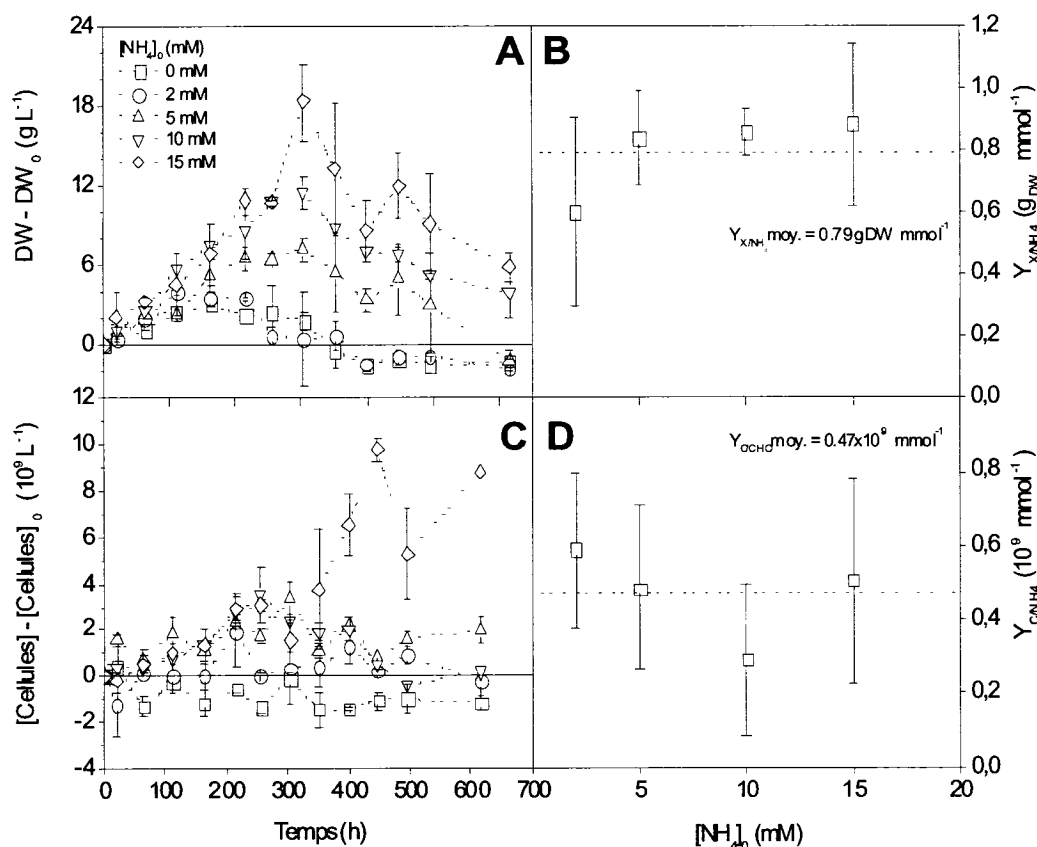
En observant les concentrations des sources de carbone pendant les cultures (figure 4.12), on remarque que pour les concentrations initiales de 0 et 2 mM de nitrate, du sucre demeure disponible pour la durée de la culture. Avec 5, 10 et 15mM les sucres sont épuisés entre 200 et 325 heures. Le plafonnement de la biomasse survient également durant cet intervalle. Les cultures avec 10 et 15 mM deviennent limitées en sucres avant d'atteindre un épuisement en nitrate. Ce qui explique les rendements inférieurs observés. Pour la culture avec 5mM, il semble que la limitation en nitrate est été atteinte avant l'épuisement des sucres puisque le rendement donne une valeur comparable à celle avec 2 mM. Le rendement de la biomasse en nitrate retenu est la moyenne des culture avec 2 et 5 mM, soit 0.72 gDW/mmol.



Les rendements en nombre de cellules ne semblent pas affectés par la limitation en sucres. Le rendement à 10 et 15 mM est comparable à celui à 2mM. Le rendement à 5 mM est cependant significativement inférieur aux autres. Ce point est écarté du calcul des rendements parce que il est due aux erreurs non quantifiées dans l'erreur du compte cellulaire. En effet, une accumulation graduelle d'agrégats cellulaires de plus en plus importants au cours des cultures est observée, compromettant considérablement la qualité du dénombrement cellulaire. Une limitation prolongée en azote semble favoriser la formation des agrégats.

#### **4.3.2 Rendements en Ammonium**

Les rendements de l'ion ammonium sont déterminés par la méthode exposée à la section 3.3.1. La biomasse et le nombre de cellules générés sont utilisés à l'axe des ordonnées pour comparer les profils de croissance pour les raisons exposées à la section 4.2.2. Les mêmes concentrations initiales que pour les rendements en nitrate sont utilisées soit 0, 2, 5, 10 et 15 mM.



**Figure 4-13 :** Rendements en ammonium. A- Profils de biomasse sèche, B- Rendements en biomasse sèche en fonction de la concentration initiale d'ammonium, C- Profils de concentration cellulaire, D- Rendements en cellules en fonction de la concentration initiale d'ammonium.

La biomasse accroît d'environ 2.5 gDW/L pour la culture privée d'ammonium. Cet accroissement est semblable à celui observé pour le rendement de la culture privé en nitrate. L'inoculum est le même pour les deux expériences (figure 4.10). Le profil de la figure 4.13A montre une génération de biomasse proportionnelle à la quantité d'ammonium à l'inoculation. Le rendement en biomasse sèche est comparable pour toutes les concentrations initiales en tenant compte des barres d'erreurs. La valeur moyenne du rendement est de 0.79 gDW/mmol. Ce rendement est sensiblement le

même que celui obtenu pour le nitrate (0.72 gDW/mmol). Afin de simplifier la modélisation exposée à la section 5, un rendement unique en biomasse sèche pour les sources d'azote est considéré en prenant la moyenne entre celui du nitrate et de l'ammonium (0.76 gDW/mmol). On pose l'hypothèse que les rendements sont identiques.

Les profils du dénombrement cellulaire permettent de déterminer un rendement moyen de  $0.47 \times 10^9$  cellules/mmol. Les barres d'erreurs des rendements en nombre de cellules se chevauchent, ce qui démontre que les valeurs calculées sont statistiquement comparables. Tout comme la biomasse, ce rendement se compare à celui du nitrate qui est de  $0.50 \times 10^9$  cellules/mmol. La moyenne de ces valeurs donne un rendement en cellules des sources d'azote (ions nitrate et ammonium) de  $0.49 \times 10^9$ /mmol. Sirois (Sirois, 2000) détermine également des rendements identiques pour ces deux ions ( $0.3 \times 10^9$  cellules/mmol) pour *E. californica*.

### 4.3.3 Cinétiques de croissance des ions azotés

Afin d'établir les relations entre la concentration extracellulaire des ions azotés et le taux de prolifération cellulaire et de croissance de la biomasse sèche, des expériences en bioréacteurs sont réalisées. L'objectif est de vérifier si la concentration extracellulaire d'une source d'azote modifie les vitesses de croissance. Les sources d'azote étudiées sont les ions ammonium et nitrate. Le test consiste à maintenir la concentration extracellulaire d'un ion azoté ( $\text{NO}_3$  ou  $\text{NH}_4$ ) à la même concentration pour deux cultures et d'imposer des concentrations différentes pour l'autre ion. De plus, l'effet toxique de l'ammonium est investigué en alimentant en excès une culture.

Afin de contrôler les concentrations extracellulaires en azote, deux solutions sont alimentées au moyen de pompes péristaltiques. Une contient du nitrate et l'autre de l'ammonium. La composition des solutions d'ajout utilisées est détaillée dans le tableau 4.2. Les concentrations en hormones, micronutriments et vitamines de ces solutions sont réduites de moitié comparativement à l'expérience de cinétique des sources de carbone puisque deux pompes alimentent simultanément les bioréacteurs (nitrate et ammonium).

**Tableau 4-2 : Composition des solutions d'ajout d'ions azotés**

	Concentration solution de nitrate	Concentration solution d'ammonium
$\text{KNO}_3$	1M	-
$\text{NH}_4$ citrate	-	1M
2,4-D	0.5 mg/L	0.5 mg/L
Kinétine	0.05 mg/L	0.05 mg/L
Micronutriments	2.5 X milieu*	2.5 X milieu*
Vitamines	2.5 X milieu*	2.5 X milieu*

\*Voir Annexe A

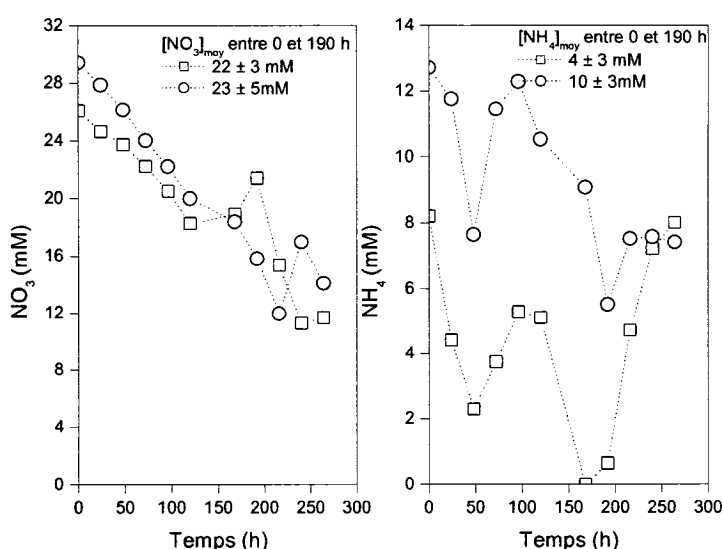
Le maintien de la concentration extracellulaire des ions azotés n'est pas aussi précis que l'étude avec le glucose. Une seule mesure de la concentration des sources d'azote pouvait être obtenue quotidiennement. Dans le cas du glucose, l'ajustement des débits d'alimentation était effectué deux fois par jour ce qui augmentait la précision du contrôle manuel. Une stratégie plus efficace devrait tenir compte du taux de consommation spécifique des ions (mmol/gDW), du volume de liquide par litre de culture et du taux de croissance afin d'ajuster les débits d'alimentation.

Puisque la consommation des ions azotés augmente de façon exponentielle (selon la croissance de la biomasse) lorsqu'il n'y a pas de limitation, la concentration de la solution d'ajout doit être soigneusement choisie et devrait même être ajustée en cours de culture. Il faut d'une part délivrer des débits d'alimentation suffisamment grand pour respecter le débit minimal des pompes péristaltiques utilisées. D'autre part, à des concentrations élevées de biomasse, le volume de solution ajouté peut devenir significativement élevé, il faut donc concentrer la solution d'ajout afin d'obtenir des débits volumiques raisonnables.

Pour toutes ces raisons, les concentrations n'ont pas été maintenues constantes pendant la présente expérience. Cependant, l'écart entre les différentes cultures fut maintenu. Par exemple, pour vérifier l'effet de l'ammonium, la concentration en nitrate dans les deux bioréacteurs n'est pas demeurée constante mais elles sont comparables pour les deux bioréacteurs. Parallèlement, la différence entre les concentrations en ammonium des deux bioréacteurs est la même pour la durée de la culture. Les résultats de cette étude auront donc une utilité plus qualitative puisque les données ne permettent pas d'obtenir des cinétiques précises.

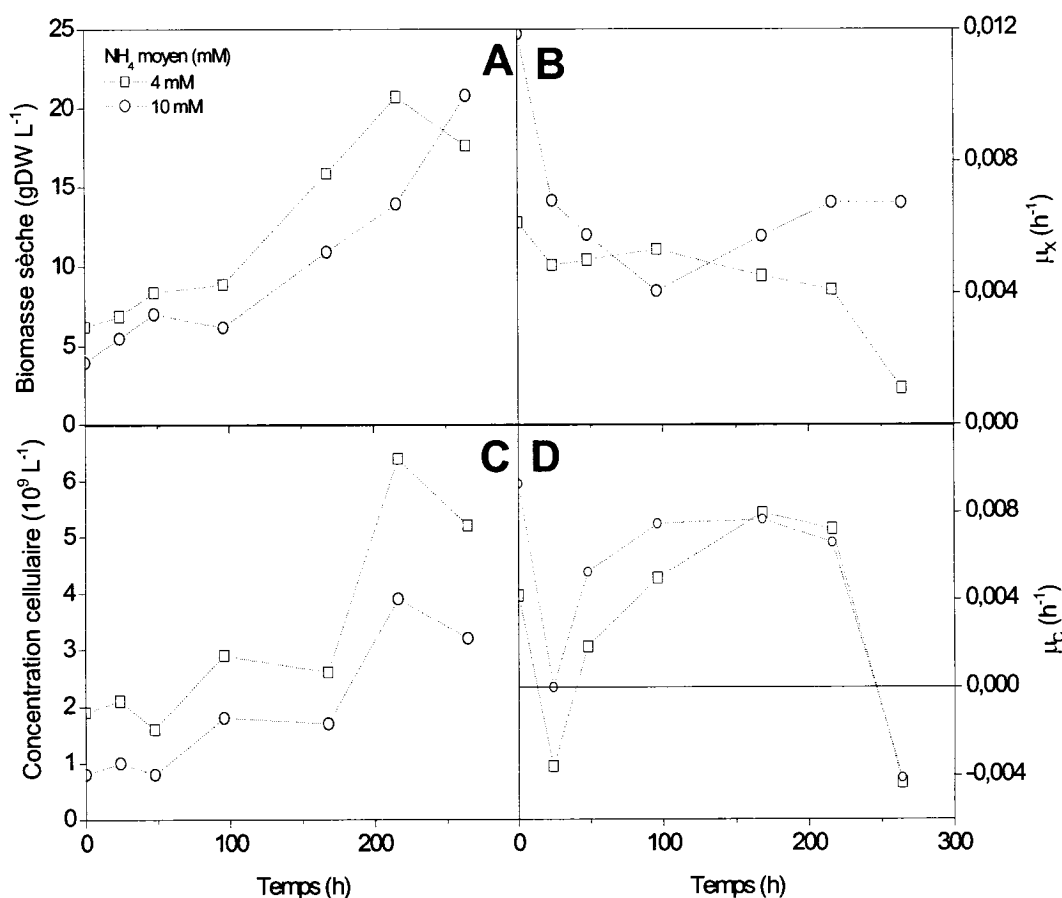
#### 4.3.3.1 Cinétique en fonction de l'ammonium

Afin de vérifier l'effet de la concentration de l'ammonium extracellulaire sur les taux de croissance, deux bioréacteurs sont utilisés. La figure suivante présente les concentrations en nitrate et en ammonium pendant les cultures. Les données brutes de ces cultures sont disponibles à l'annexe D.



**Figure 4-14 :** Concentration des ions azotés des cultures de cinétique de croissance en ammonium.

Les concentrations en nitrate sont comparables pour les deux cultures. Dans le cas de l'ammonium, la différence entre les deux cultures est maintenue entre 6 et 10 mM jusqu'à 190 heures. La valeur moyenne de la culture ayant le plus d'ammonium est de 10 mM alors que l'autre est de 4 mM. Les erreurs sur les concentrations indiquées dans la légende de la figures 4.14 représentent l'écart type des concentrations entre 0 et 190 heures.



**Figure 4-15 :** Cinétique de croissance en fonction de la concentration en ammonium. . A- Profils de biomasse sèche, B- Taux de croissance de la biomasse sèche en fonction temps, C- Profils de concentration cellulaire, D- Taux de prolifération cellulaire en fonction du temps.

En observant les profils de biomasse sèche, on remarque que les deux cultures croissent sensiblement aux mêmes taux. L'écart entre les courbes de biomasse est due à la différence à l'inoculation. Cet écart est maintenu tout au long de la culture. Les taux de croissance à l'inoculation et à la fin de la culture sont plus sensibles à l'erreur expérimentale puisqu'ils ne sont pas le résultat d'une moyenne. En effet, pour les autres échantillons, le taux de croissance est obtenu par une moyenne de trois taux de croissance (voir section 3.8), ce qui permet un certain lissage des données. Pour cette raison, les premiers taux des cultures sont plus élevés que les autres. Le dernier point en biomasse pour la culture à 3mM de  $\text{NH}_4$  indique une interruption soudaine de la

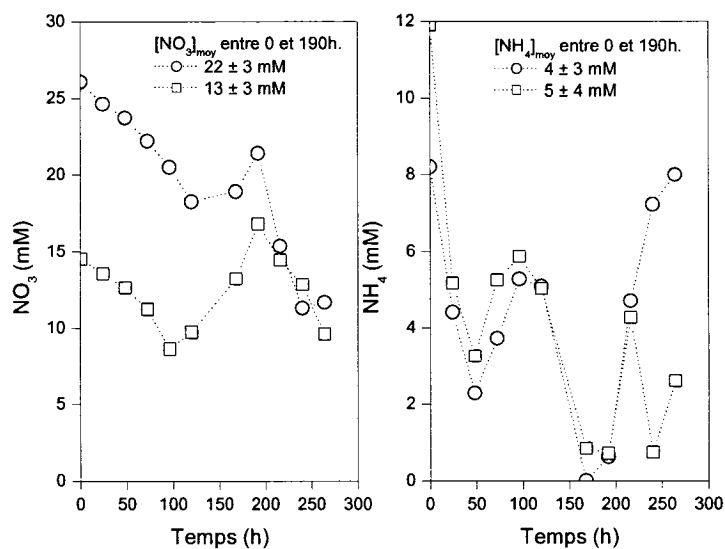
croissance. Cette chute est attribuée à la densité de la culture à ce moment de la culture (420 gWW / L) et aux difficultés du contrôle de l'oxygène reliées à la consommation d'oxygène de la culture qui excédait les limites du système ( $>200$  cc/min d'oxygène). Les taux de croissances (4-15B) sont comparables entre 24 et 225 heures, soit la phase de croissance exponentielle. Les taux moyens sont de  $0,0048 \pm 0,0005 \text{ h}^{-1}$  pour la culture avec 4 mM et de  $0,006 \pm 0,001 \text{ h}^{-1}$  pour celle avec 10 mM.

Le même décalage entre les profils de dénombrement cellulaire est observé. Ces derniers sont moins réguliers que ceux de la biomasse sèche et présentent une forme en dents de scies. Cette situation illustre bien la variabilité de la technique de dénombrement cellulaire. Les taux de prolifération moyens sont calculés entre 50 et 225 heures. Les valeurs obtenues sont de  $0.005 \pm 0.003 \text{ h}^{-1}$  et de  $0.006 \pm 0.001 \text{ h}^{-1}$  respectivement pour les cultures avec 4 et 10 mM d'ammonium. Il n'est pas possible, avec ces résultats, d'identifier une influence sur les vitesses de croissance entre 4 et 10 mM d'ammonium.

#### **4.3.3.2 Cinétique en fonction du nitrate**

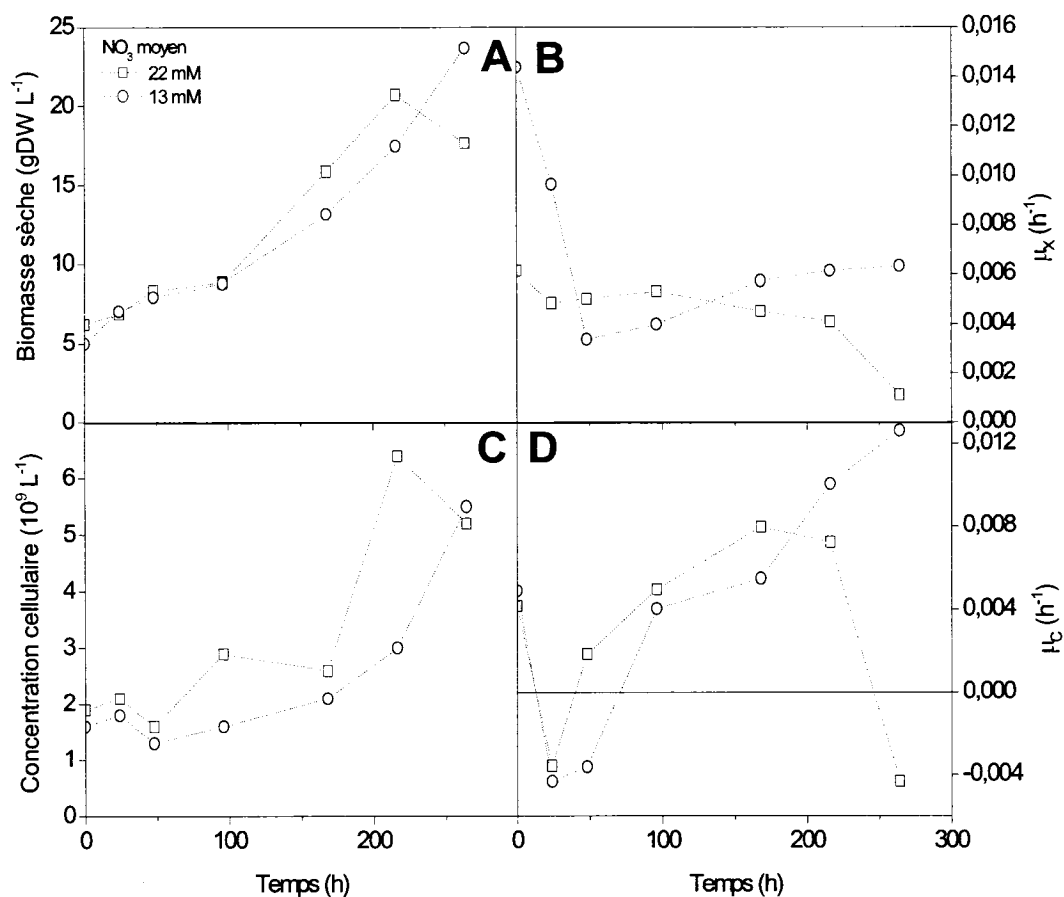
La même approche est utilisée pour le nitrate. La figure 4.16 présente les concentrations en nitrate et en ammonium pendant les cultures. La culture ayant en moyenne 22 mM de nitrate est la même que celle présentée à la section précédente. On la compare cette fois avec une culture ayant la même concentration en ammonium et une concentration en nitrate environ deux fois moins élevée.





**Figure 4-16 :** Concentration des ions azotés des cultures de cinétique de croissance en nitrate.

Les concentrations en ammonium sont comparables entre 0 et 250 heures pour les deux cultures. L'écart entre les concentrations de nitrate est maintenu jusqu'à 190 heures. Les concentrations moyennes en nitrate sont de 22 et de 13 mM pour les 190 premières heures.



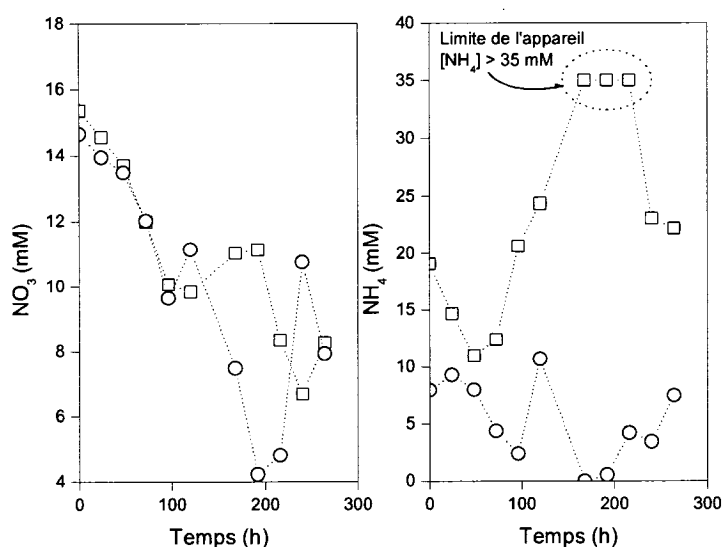
**Figure 4-17 :** Cinétique de croissance en fonction de la concentration en nitrate. A- Profils de biomasse sèche, B- Taux de croissance de la biomasse sèche en fonction temps, C- Profils de concentration cellulaire, D- Taux de prolifération cellulaire en fonction du temps.

La figure 4.17B montre que les deux cultures croissent à des vitesses comparables durant la phase exponentielle. Les taux moyens, calculés sur la partie numériquement stable des profils des taux de croissance sont de  $0,0048 \pm 0,0005 \text{ h}^{-1}$  pour la culture avec 22 mM et de  $0,005 \pm 0,001 \text{ h}^{-1}$  pour celle avec 13 mM.

Le taux de croissance moyen en cellules est calculé entre 50 et 225 heures pour la culture avec 22 mM de nitrate et donne  $0,005 \pm 0,003 \text{ h}^{-1}$ . Pour l'autre culture, le taux moyen est calculé entre 100 et 225 heures. Le taux à 50 heures n'est pas inclus puisque sa valeur est affectée par les comptes cellulaires à 24 et 50 heures. La stabilisation numérique du taux de croissance est atteinte à partir de 100 heures. Le taux moyen est de  $0,007 \pm 0,003 \text{ h}^{-1}$ .

#### 4.3.3.3 Surdose d'ammonium

Afin de vérifier à quelle concentration l'ammonium devient toxique, une culture est alimentée avec des quantités élevées de cet ion. La figure 4.18 présente les concentrations en nitrate et en ammonium pendant les cultures.

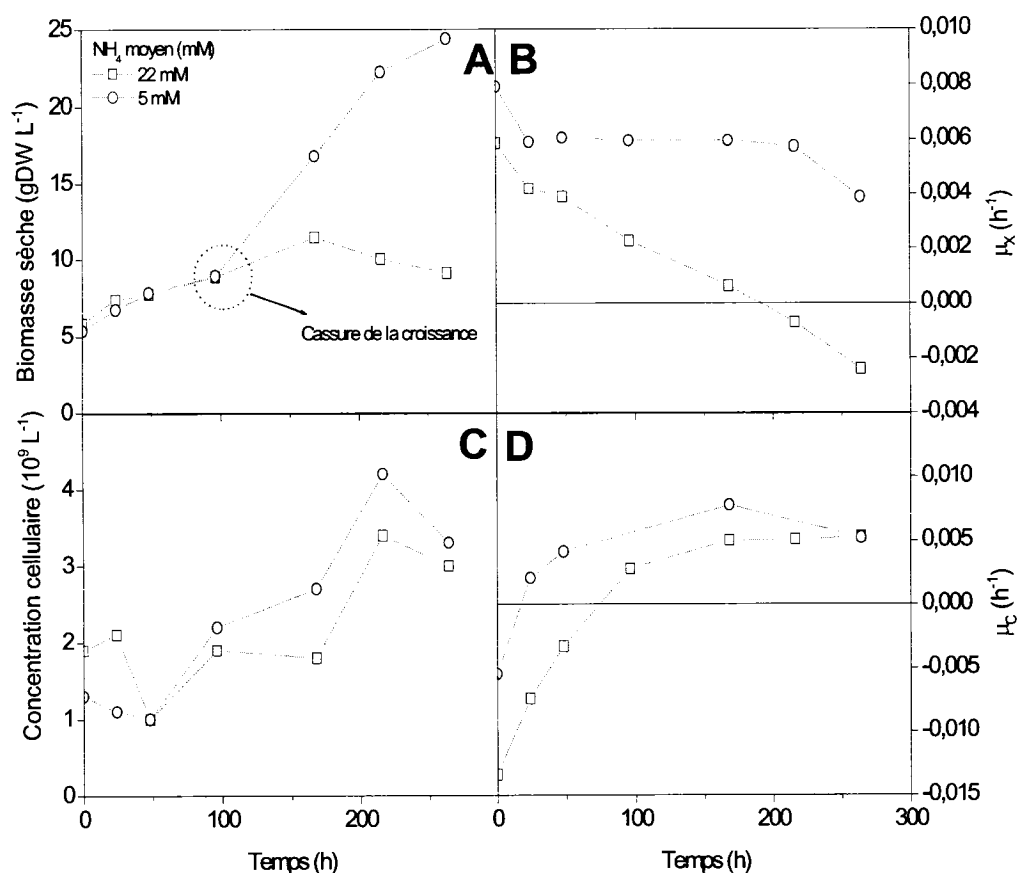


**Figure 4-18 :** Concentration des ions azotés pour la cinétique de croissance avec surdose d'ammonium.

Les concentrations en nitrate sont comparables jusqu'à 100 heures. À partir de ce moment, la concentration chute rapidement pour le réacteur avec une concentration en ammonium plus faible. À 200 heures, l'azote est pratiquement épuisée. Cet

épuisement est due au débit d'ajout des pompes qui n'était pas suffisamment élevé pour soutenir la demande.

Dans l'autre bioréacteur, l'ammonium est maintenue à au moins 10mM durant toute la culture. Vers 180 heures, la quantité ajoutée était telle que la concentration dépassait la limite de lecture du HPLC (35mM). La concentration est supérieure à 35mM jusqu'à 220h. L'effet de la concentration élevée en ammonium sur la croissance peut être observé à la figure 4.19.



**Figure 4-19 :** Cinétique de croissance pour la surdose d'ammonium. A- Profils de biomasse sèche, B- Taux de croissance de la biomasse sèche en fonction du temps, C- Profils de concentration cellulaire, D- Taux de prolifération cellulaire en fonction du temps.

Les profils de biomasse montrent que le bioréacteur à haute concentration en ammonium présente une croissance plus faible. Vers 100 heures, une cassure de la croissance est observée. Les taux de croissance en 4.19B montrent que la vitesse de croissance de cette culture diminue graduellement, à mesure que la concentration en ammonium augmente dans le milieu de culture (figure 4.18). La cassure de la

croissance coïncide à une concentration de 20mM en ammonium. Pour l'autre bioréacteur, la croissance exponentielle est maintenue jusqu'à environ 225 heures avec un taux de croissance de  $0.006 \text{ h}^{-1}$ . À partir de ce moment, la diminution de la vitesse de croissance est attribuée à la haute densité cellulaire dans le bioréacteur. L'impact sur le taux de prolifération ne semble pas aussi drastique mais la concentration cellulaire entre 100 heures (cassure du DW) et 170 heures semble stagner.

#### **4.3.3.4 Conclusions des cinétique de croissance des ions azotés.**

À la lumière des expériences de cinétique de croissance avec les ions azotés, le seul effet évident observé provient d'une surdose en ammonium. En effet, pour des concentrations nitrate variant entre 13 et 22mM et entre 4 et 10 mM en ammonium, les taux de croissance sont constants. Cependant, pour une valeur moyenne de 22 mM d'ammonium, on observe un effet d'inhibition. Cet effet d'inhibition n'est pas aussi évident pour le taux de prolifération cellulaire et il est difficile de conclure si il est inhibé ou non. On retient la possibilité qu'il le soit et les simulations lors du développement du modèle à la section 5 permettront de le vérifier.

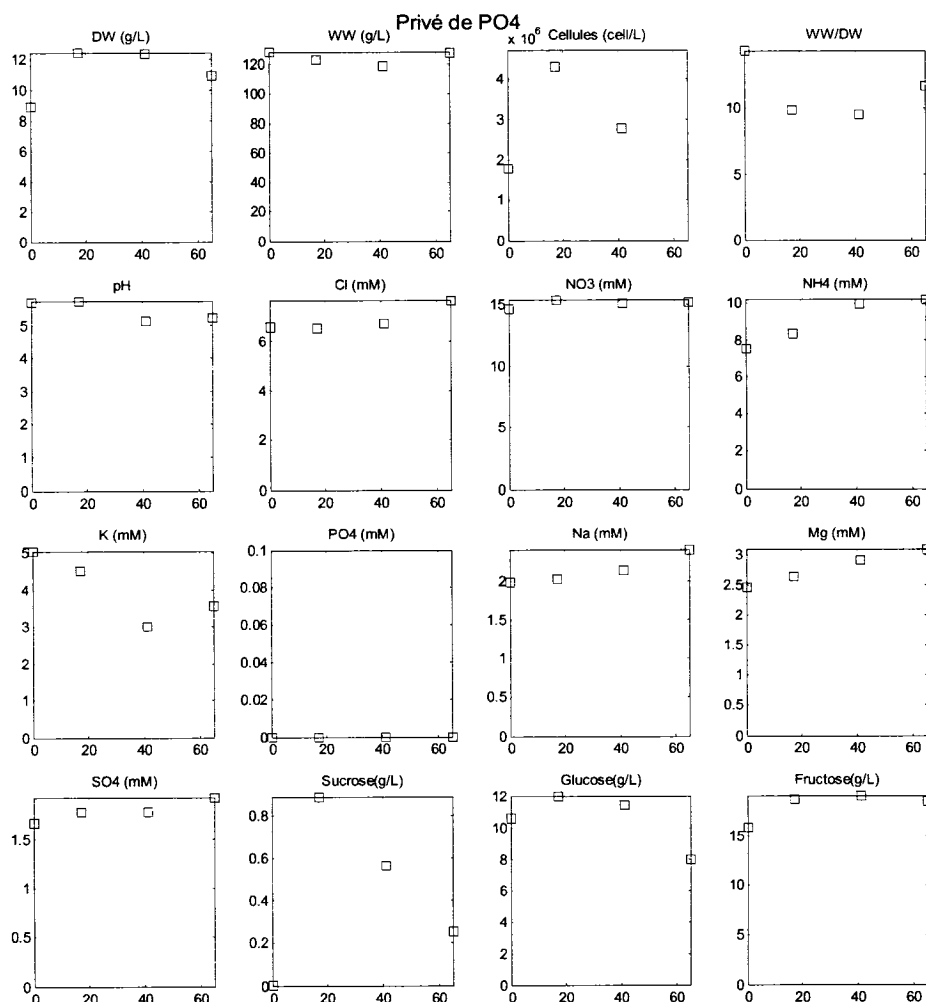
Des expériences avec des concentrations plus faibles en nitrate et en ammonium devraient être effectuées afin d'obtenir des détails sur les taux de croissance à des concentrations inférieures à celles observées. Sirois (Sirois, 1997) utilise des fonctions échelons pour les ions azotés dans le calcul des taux de croissance et on peut poser l'hypothèse que *C. roseus* se comporte de la même façon. Les conclusions tirées de cette expérience sont que les taux de croissance et de prolifération sont constants entre 13 mM et 22 mM de nitrate et que l'ammonium inhibe ces taux de croissance à partir d'environ 20 mM. L'absence d'inhibition par le nitrate aux concentrations étudiées est plausible si on compare les résultats obtenus par Prakash et Srivastava(2005). Ils observent une inhibition de la croissance à partir de 100 mM (Figure 2-9).

## 4.4 Effet du phosphate

Dans la nature, la forme assimilable de phosphate, l'ion  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ , n'est disponible qu'en faible concentration (2-10  $\mu\text{M}$ ) dans le sol (Raghothama, 1999). De plus, un gradient de concentration en périphérie des racines est observé due à la faible diffusion de l'ion dans le sol ( $10^{-12}\text{m/s}$  - Schachtman et al., 1998), exposant ces dernières à des concentrations souvent plus faible que 5  $\mu\text{M}$  (Poirier et Buchner, 2002). Les plantes doivent stocker cet ion afin de suffire aux demandes métaboliques. Les concentrations typiquement utilisées dans les milieux de cultures synthétiques sont de l'ordre du mM. Le phosphate est épuisé du milieu de culture en quelques heures et stocké dans les compartiments intracellulaires pour être éventuellement utilisé par le métabolisme.

### 4.4.1 Rendements en phosphate

La détermination des rendements en phosphate s'effectue de la même manière que pour les sources de carbone et d'azote (section 4.2.2). La suspension cellulaire utilisée est d'abord conditionnée de manière à limiter la croissance par un épuisement en phosphate. Par la suite, ce stock de cellules est répartie dans quinze flacons de 500ml. Quatre concentrations initiales en phosphate sont testées soit 0,25 mM, 0,50 mM, 0,75 mM et 1.00 mM. Chaque concentration est effectuée en triplicata. De plus, une culture témoin sans phosphate est démarée, également en triplicata, afin de corriger la formation de biomasse et la prolifération cellulaire. La figure 4.20 présente les concentrations mesurées pendant le conditionnement des cellules privées de phosphate.

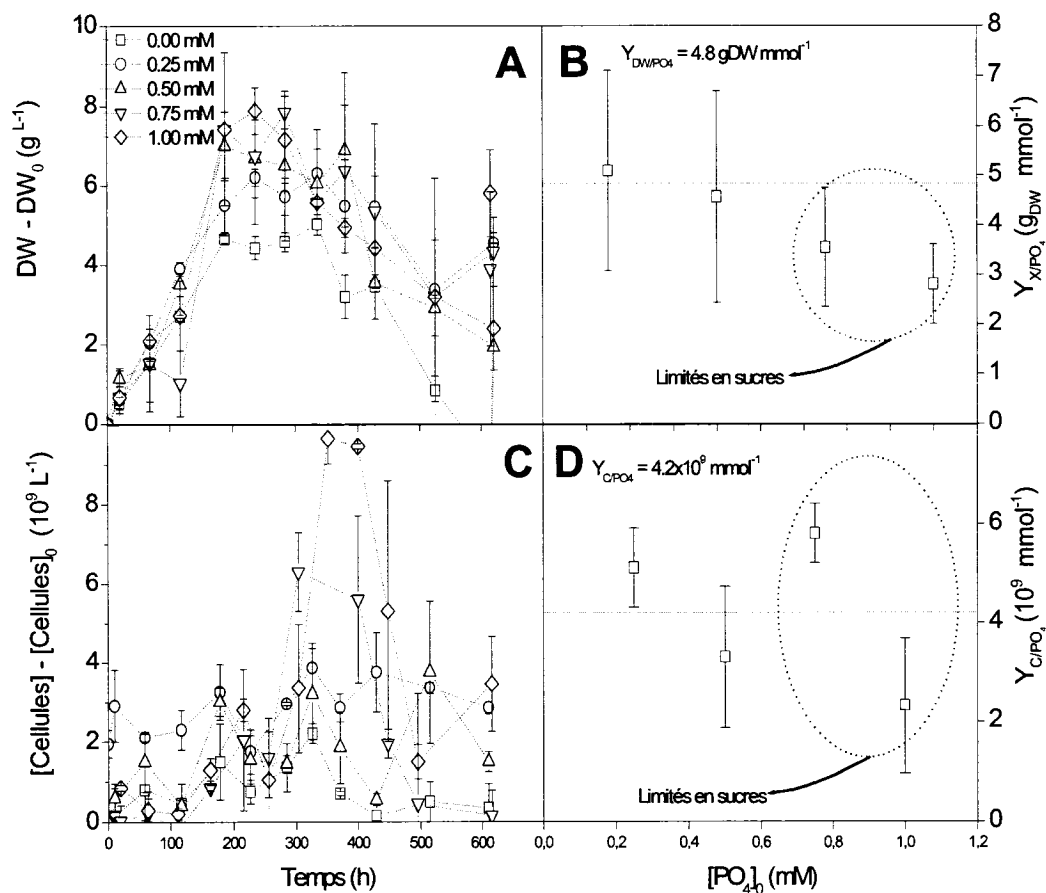


**Figure 4-20 :** Suspension privée de phosphate.

Pendant le conditionnement des cellules, la biomasse sèche croît d'environ 3 g/L pendant les 20 premières heures de culture puis plafonne. On remarque que la consommation des autres nutriments est nulle sauf pour le glucose dont environ 3 g/L sont consommé entre 40 et 60 heures. Une limitation de la croissance de la suspension due au manque de phosphate est atteinte, les réserves intracellulaires sont épuisées.



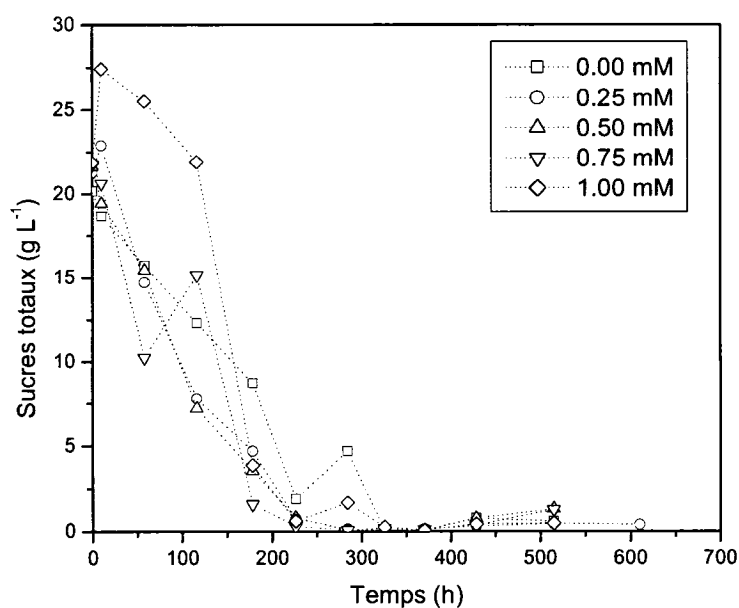
Avec ce stock de cellules, on procède aux expériences de détermination des rendements en biomasse sèche et en prolifération cellulaire de l'ion phosphate. Les résultats sont présentés à la figure suivante.



**Figure 4-21 :** Rendements en phosphate. A- Profils de biomasse sèche, B- Rendements en biomasse sèche en fonction de la concentration initiale de phosphate, C- Profils de concentration cellulaire, D- Rendements en cellules en fonction de la concentration initiale de phosphate.

Les profils de biomasse sèche (figure 4.21A) montrent une augmentation de la biomasse produite selon la quantité de phosphate fournie à l'inoculation. Cependant, les rendements obtenus suivent une relation qui décroît linéairement. Comme dans la détermination des rendements en nitrate, ces résultats suggèrent une limitation de la croissance autre que celle en phosphate. L'analyse des concentrations des sources de

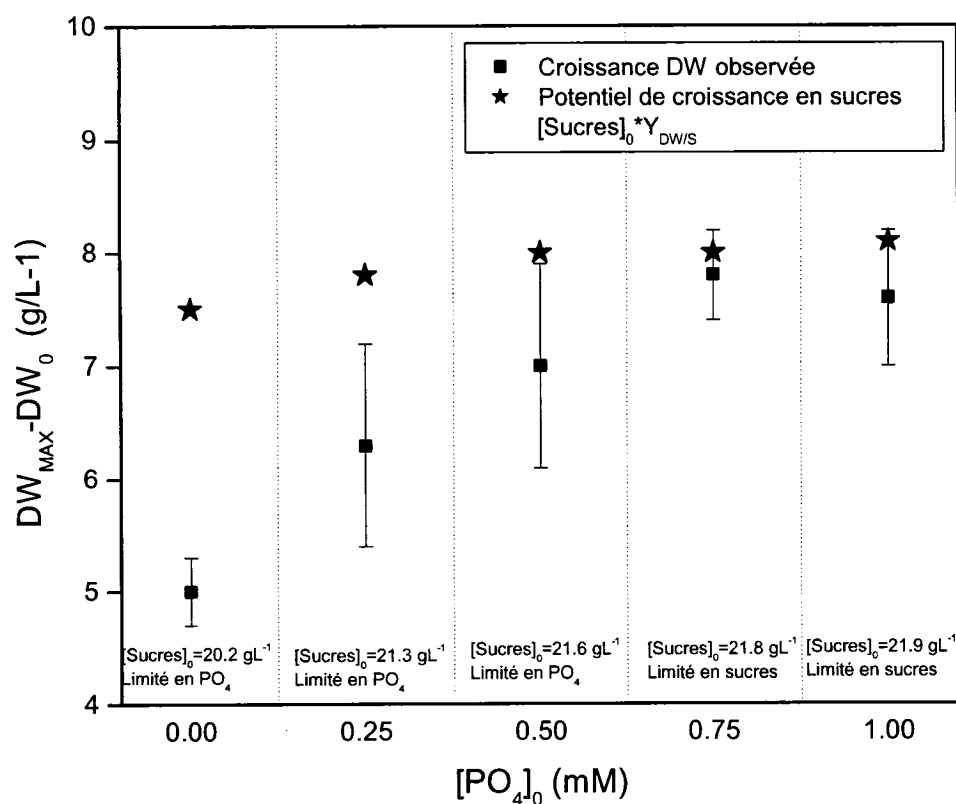
carbone (figure 4.22) démontre que ces derniers sont pratiquement épuisés dans toutes les cultures vers 200 heures, ce qui correspond à l'arrêt de la croissance pour les cinq expériences. On aurait dû s'attendre à un plafonnement graduel des croissances en fonction de la dose de phosphate.



**Figure 4-22** : Sucres totaux (sucrose, glucose et fructose) des cultures de rendement en phosphate.

Afin de vérifier si l'arrêt de la croissance est due à l'épuisement des sucres ou du phosphate, on utilise la valeur de rendement en sucres obtenue à la section 4.2.2 (0.37 gDW/g). Avec la concentration initiale de sucres, on calcul la formation de biomasse sèche qui peut potentiellement être générée en multipliant la concentration initiale en sucres avec son rendement. Si la croissance de biomasse sèche observée est inférieure à cette valeur, on considère que la limitation de croissance est attribuable à l'épuisement est phosphate. La figure 4.23 illustre les résultats de ces calculs. Le potentiel de croissance en sucres ne tient pas compte des réserves intracellulaires des cellules à

l'inoculation (amidon et autres) et sa comparaison avec l'accroissement de la biomasse sèche mesurée peut être biaisée.



**Figure 4-23 :** Comparaison de la biomasse générée et du potentiel de croissance en sucres.

La culture sans phosphate croît tout de même de 5 gDW/L en biomasse sèche malgré une privation prolongée en phosphate. Ceci peut être attribué à une réorganisation intracellulaire des ressources (Sirois 2000). Cette croissance est inférieure au potentiel de croissance des sucres fournis, on peut donc affirmer que la limitation de la croissance vient bel et bien d'une limitation en phosphate. Les cultures avec 0.25 et 0.50 mM sont également limitées en phosphate selon les calculs présentés à la figure 4.23. En tenant compte de l'erreur de la biomasse générée, le potentiel de croissance en

sucres n'est pas atteint. Pour ce qui est des cultures à 0.75 et 1.00 mM, l'accroissement de biomasse observé correspond à la croissance possible selon les rendements en sucres, ces cultures sont donc écartées du calcul des rendements en phosphate.

Des rendements calculés à la figure 4.21B, seulement les cultures avec 0.25 et 0.50 mM sont utilisés pour calculer le rendement en biomasse sèche du phosphate. La moyenne est de 4.8 gDW/mmol. Le rendement cellulaire est déterminé de la même manière et donne  $4.2 \times 10^9$  cellules/mmol. Sirois (Sirois, 2000) obtient  $6.6 \times 10^9$  cellules/mmol avec *E californica*.

#### 4.4.2 Cinétique en fonction du phosphate

La détermination d'une cinétique de croissance en fonction du phosphate est plus complexe que celle des sources de carbone ou d'azote. Puisque les concentrations observées sont faibles (environ 1 mM) et que les cellules consomment rapidement ce phosphate, l'utilisation des concentrations extracellulaires est impossible. Dans ces conditions, la mesure du phosphate intracellulaire libre est la mesure utilisée pour étudier les cinétiques de croissance. Une relation entre le phosphate libre intracellulaire et les vitesses de croissance de biomasse sèche et de prolifération cellulaire est recherchée.

Certaines réserves doivent être exprimées quand à l'utilisation du phosphate intracellulaire libre. L'homéostasie cellulaire agit de façon à conserver une concentration intracellulaire idéale. Lorsque le phosphore inorganique passe du côté intracellulaire, une partie est entreposée dans des molécules organiques (Olczak et al., 2003). Ce phosphore entreposé ne contribue pas directement à la croissance et est invisible lorsqu'on mesure le phosphate intracellulaire. D'autre part, la méthode de mesure du phosphate intracellulaire libre utilisée nécessite de briser les cellules afin d'en extraire le phosphate libre. Malgré l'utilisation d'azote liquide afin de réduire

l'activité des enzymes, cette manipulation peut avoir pour effet de libérer des phosphatases et venir fausser la mesure.

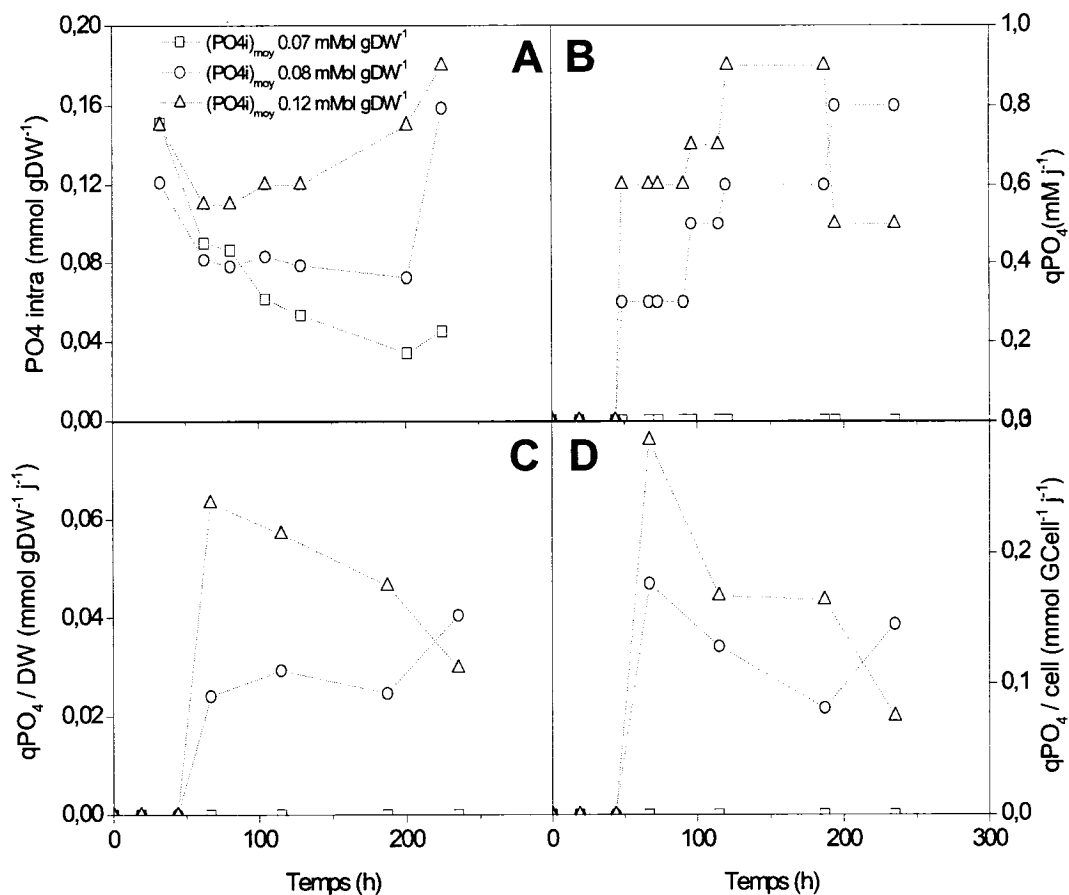
Trois cultures en bioréacteur sont réalisées. Puisque la concentration intracellulaire ne peut être facilement prédite, la méthode suivante est utilisée. Dans un premier bioréacteur, 1 mM de phosphate est fourni à l'inoculation. Dans le second, en plus de la même concentration initiale, on ajoute une solution de phosphate à l'aide d'une pompe péristaltique de manière à maintenir les concentrations intracellulaires supérieures à celles du premier réacteur. Finalement, les concentrations intracellulaires du dernier bioréacteur doivent être les plus élevées des trois, le débit de la solution d'ajout de phosphate est ajusté en conséquence. Les solutions d'ajouts de phosphate contiennent également hormones, micronutriments et vitamines afin d'éviter toute limitation de croissance. Les autres nutriments mesurés sont ajoutés ponctuellement. Le tableau 4.3 expose la composition de la solution d'ajout de phosphate.

**Tableau 4-3 :** Composition de la solutions d'ajout de phosphate.

Concentration solution de Phosphate	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	25mM
2,4-D	1 mg/L
Kinéline	0.1 mg/L
Micronutriments	5 X milieu standard*
Vitamines*	5 X milieu standard*

\*Voir Annexe A.

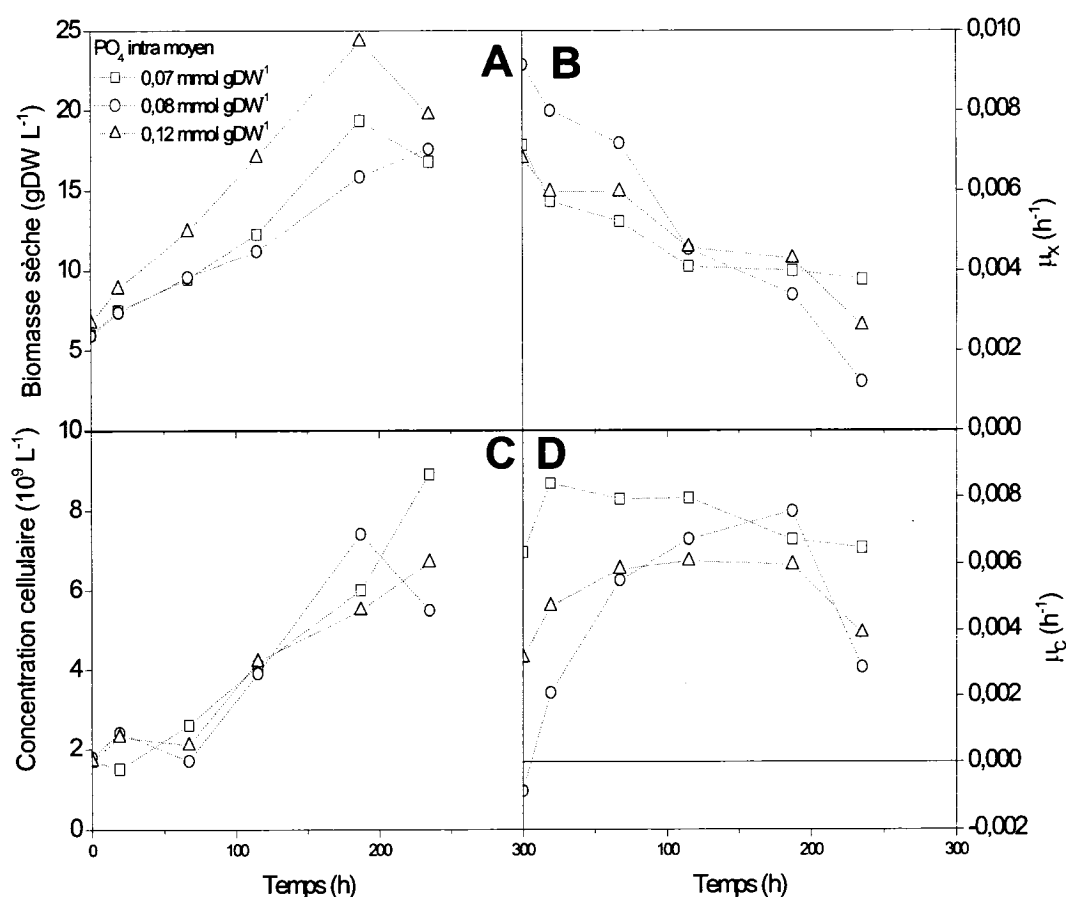
La figure 4.24 montre les concentrations intracellulaires de phosphate libre mesurées, le débit de phosphate ajouté pendant la culture ainsi que le rapport de ce dernier avec la biomasse et le dénombrement cellulaire. La concentration intracellulaire n'est pas disponible pour t=0. Un problème de manipulation a rendu les échantillons inutilisables.



**Figure 4-24 :** Concentrations de phosphate intracellulaire et débits d'alimentation en phosphate.

La concentration intracellulaire moyenne est calculée entre 63 et 200 heures. La première mesure est éliminée car aucun ajout n'avait encore été effectué (4-24B). La fin des cultures à 250 heures correspond à l'atteinte des limites du système. La densité cellulaire élevée rendait le mélange difficile et il est probable que les cellules furent limitées en oxygène puisque les débitmètres délivraient le débit maximal. Le premier bioréacteur, avec  $[\text{PO}_4]_{i, \text{moy}}$  à  $0.07 \text{ mMol/gDW}$ , ne reçoit aucun ajout de phosphate pour la durée de l'expérience. La concentration intracellulaire diminue graduellement en

cours de culture. Dans le second bioréacteur, la concentration intracellulaire est relativement constante avec une moyenne à 0.08 mmol/gDW. Pour le dernier, la concentration est supérieure aux deux autres avec une moyenne de 0.12 mmol/gDW. Les données brutes de ces cultures sont disponibles en annexe. La figure 4.25 montre les profils de biomasse sèche et de dénombrement cellulaire ainsi que leurs taux de croissance respectifs.

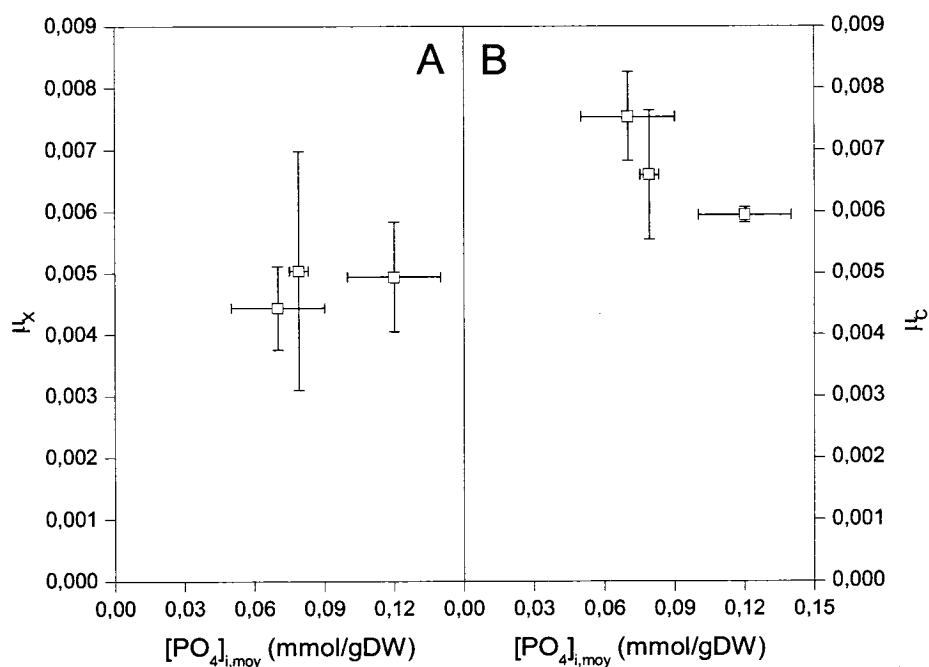


**Figure 4-25 :** Profils de croissance en fonction du phosphate. A- Profils de biomasse sèche, B- Taux de croissance de la biomasse sèche en fonction du temps, C- Profils de concentration cellulaire, D- Taux de prolifération cellulaire en fonction du temps.

Aucun effet évident n'est observé sur les taux de croissance et de prolifération. Les taux de prolifération semblent plus élevés pour la culture avec 0.07 mmol/gDW mais

l'examen des profils de concentration cellulaire (4.25B) suggère que les cultures croissent à la même vitesse. On ne peut conclure à une inhibition ou à une variation des taux de croissance en fonction des concentrations intracellulaires observées.

Il aurait été intéressant d'observer le comportement d'un surdose en phosphate comme ce fut le cas pour l'ammonium. La figure 4.26 regroupe les taux de croissance moyens en fonction de la concentration intracellulaire de phosphate libre. L'erreur de  $\mu_c$  à 0.12 mmol/gDW est l'écart type des taux de prolifération calculés pour cette culture et ne quantifie pas l'erreur du décompte manuel des cellules. On ne peut prétendre à une inhibition de  $\mu_c$ .



**Figure 4-26 :** Taux de croissance moyen de la biomasse sèche (A) et du nombre de cellules (B) et en fonction de la concentration intracellulaire de phosphate libre.



## **5 Modélisation**

La modélisation de la croissance d'une suspension de cellules végétales proposée ici est inspirée du modèle de Sirois (1997), développé pendant sa maîtrise et révisé durant son doctorat (Sirois, 2000). L'approche privilégiée consiste à déterminer, dans la mesure du possible, les paramètres nécessaires par expérimentation et de modifier au besoin la structure du modèle. Les études sur la croissance de la section 4 ont permis de déterminer les rendements en sources de carbone, en azote et en phosphate pour la biomasse sèche et la prolifération cellulaire. De plus, de l'information sur les cinétiques de croissance en fonction des nutriments majeurs a également été obtenu dans cette section.

Cette section expose le développement du modèle. Il est d'abord présenté dans sa forme la plus générale, le schéma réactionnel. Les équations différentielles régissant les bilans de matière des variables d'état du modèle sont par la suite développées à partir de ce schéma.

Ayant en main les bilans de masse, les cinétiques d'absorption des nutriments extracellulaires et les équation des taux de croissance sont définis. Ensuite, les paramètres inconnus du modèle sont estimés à l'aide de simulations numériques. Le modèle est validé par des cultures en bioréacteur n'ayant pas servies à la détermination de ces paramètres. Une étude de sensibilité des paramètres du modèle est également présentée afin d'apprécier l'impact de ces derniers sur l'estimation du modèle. Finalement les limites du modèle sont établies.

Avant d'entreprendre le développement détaillé du modèle et afin de faciliter la lecture des prochaines sections, un retour sur la méthodologie du projet, exposée à la section

1.3, est proposé. L'ordre chronologique des étapes ayant mené au développement du modèle est illustré à la figure 5.1. Les résultats obtenus pour chaque étape sont indiqués.

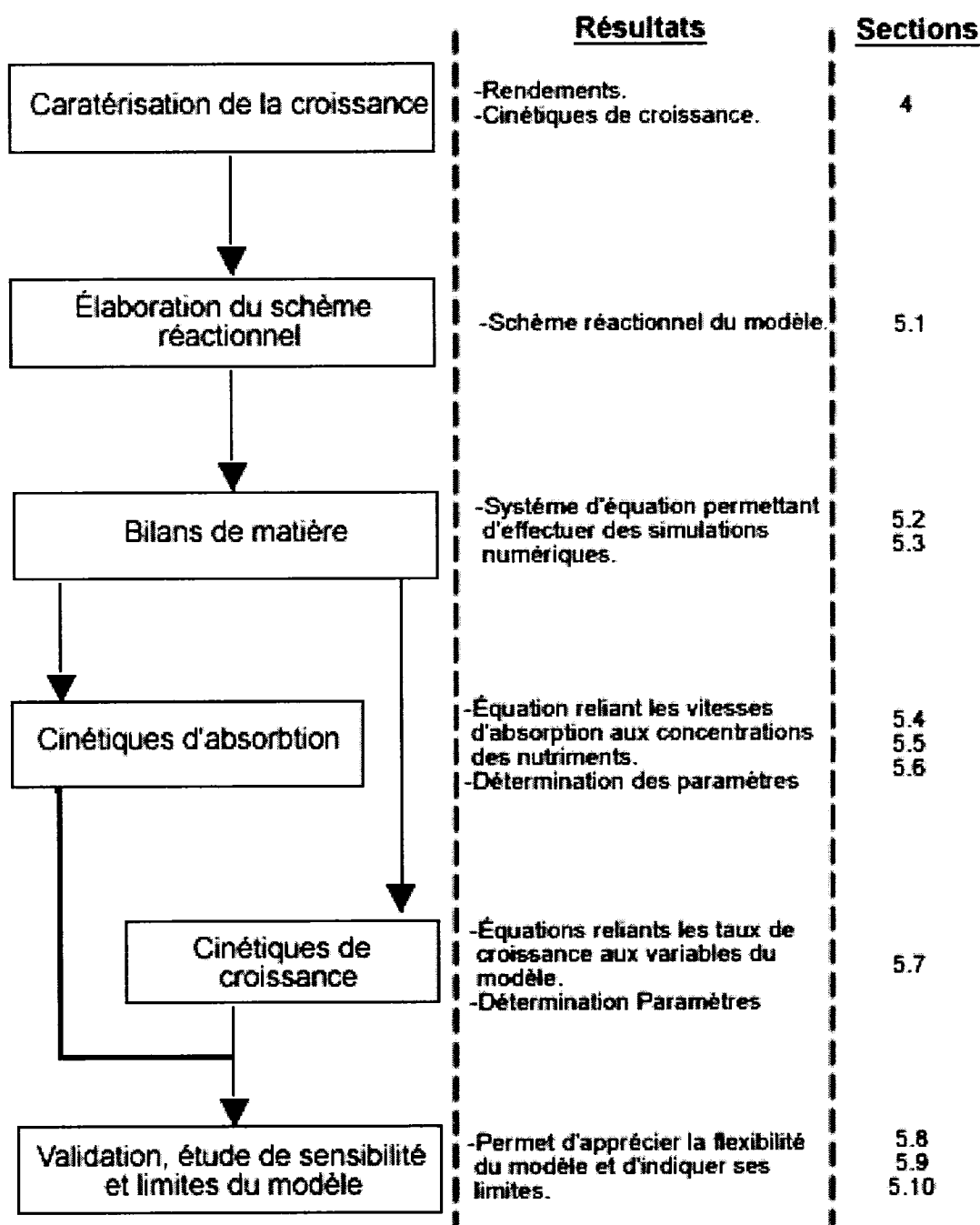
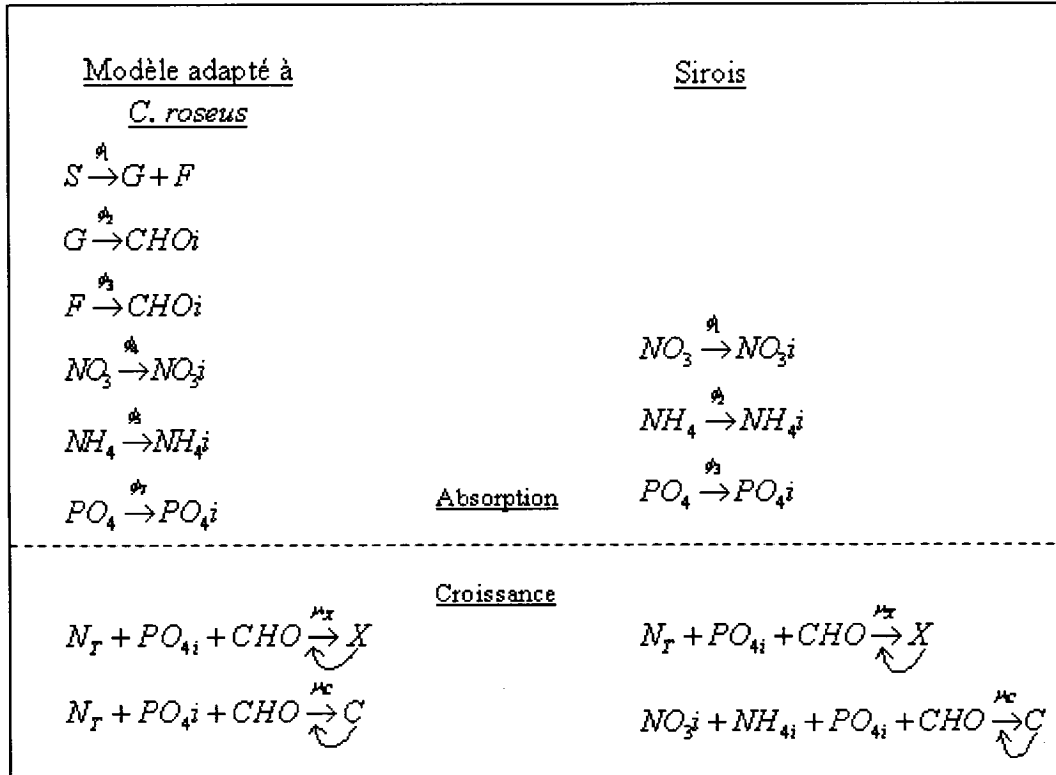


Figure 5-1 : Retour sur la méthodologie du projet.

## 5.1 Schème réactionnel.

Le schème réactionnel consiste à illustrer les interactions entre les variables d'état du modèle. Les conventions utilisées sont celles utilisées pour décrire des réactions chimiques. Des réactifs forment des produits à un taux déterminé par une vitesse de réaction ( $\phi$  pour l'absorption des nutriments et  $\mu$  pour la croissance). La vitesse de réaction peut être constante ou varier en fonction de la concentration des produits, des réactifs ou d'un inhibiteur. Cette représentation du modèle permet de comprendre la dépendance entre les variables du modèle en un coup d'œil.

La figure 5.2 présente le schème réactionnel proposé pour le modèle de croissance de *C. roseus* à gauche. À droite, on retrouve le modèle qui sert de point de départ à la présente modélisation, celui de Sirois (Sirois, 1997 et Sirois, 2000).



**Figure 5-2 :** Schème réactionnel du modèle.

*S*-Sucrose, *G*-Glucose, *F*-Fructose,  $N_T$ -ions azotés ( $NO_3 + NH_4$ ), *CHO* – Sources de carbone (Glucose + Fructose), indice *i* – intracellulaire, *X* – Biomasse sèche, *C* – Dénombrement cellulaire.

Les six premières réactions représentent l'absorption des nutriments. Les nutriments extracellulaires sont les réactifs alors que les produits sont les nutriments intracellulaires. Les taux d'absorption  $\phi_i$  sont développés aux sections 5.4, 5.5 et 5.6. Le modèle présente des différences avec celui Sirois. D'abord, l'absorption des sources de carbone est considérée. Sirois considère que les sucres étaient convertis en biomasse dès leur passage dans le compartiment intracellulaire et consommés selon le rendement en biomasse sèche. Ici, les sucres sont toujours transformés en biomasse dès leur absorption mais le bilan de matière ne tient pas compte du rendement et est basé sur les cinétiques d'absorption. Le sucrose n'est pas considéré comme un nutriment dans le modèle, seulement le glucose et le fructose sont inclus comme source de carbone assimilable.

Les concentrations intracellulaires n'ont pas pour but de prédire les concentrations intracellulaires réelles. Elles sont utilisées pour tenir compte de l'épuisement d'un nutriment ou d'une éventuelle accumulation dans les cellules. Leur valeur ne tient pas compte du stockage sous d'autres formes ni de la quantité présente à l'inoculation.

Les réactions de croissance représentent la formation de biomasse sèche (X) et la prolifération cellulaire (C). Les réactions pour la prolifération cellulaire sont différentes pour les deux modèles en ce qui a trait aux ions azotés. En effet, Sirois (Sirois, 2000) utilisait les concentrations intracellulaires comme variables régissant la division cellulaire. Pour le modèle proposé ici, les concentrations extracellulaires d'azote sont utilisées. La principale raison du changement provient du fait que les concentrations intracellulaires ne sont pas mesurées lors des cultures de ce projet. Il est donc impossible d'utiliser avec précision cette variable. De plus, la concentration intracellulaire à l'inoculation est inconnue et on peut supposer que celle-ci varie en fonction de l'état des cellules utilisées. Or, cette variable est essentielle afin de prédire le temps pendant lequel les cellules continueront de croître sur les réserves d'azote. On accepte le fait que cette lacune du modèle sera «absorbée» dans la détermination des paramètres par minimisation de l'erreur d'estimation.. Le principal désavantage est que le modèle ne tient pas compte de l'accumulation des ions azotés du côté intracellulaire. La croissance s'arrête dès que la concentration extracellulaire en ammonium et en nitrate devient nulle. Les ions azotés intracellulaire sont tout de même présentés dans les résultats de simulation même s'il n'ont aucune influence sur les taux de croissance. Ils sont utilisés simplement pour s'assurer du respect des rendements déterminés aux sections 4.3.1 et 4.3.2.

L'utilisation du phosphate intracellulaire dans les cinétiques de croissance est cependant conservée puisque son absorption est rapide et que les concentrations extracellulaires mesurées sont pratiquement toujours nulles (sauf à l'inoculation). La variable  $PO_4_i$  représente un pool de phosphate intracellulaire qui est consommé en

fonction de la prolifération cellulaire et selon le rendement en cellules déterminé à la section 4.

L'effet auto catalytique de la croissance exponentielle est représenté par les flèches circulaires partant de X et de C. Par exemple, une seule cellule peut se diviser pour former deux cellules filles alors que dix cellules en produisent vingt. Plus il y a de biomasse ou de cellules, plus l'augmentation est importante. La formation de biomasse et la prolifération cellulaire évoluent selon des taux de croissance  $\mu_X$  et  $\mu_C$  respectivement. Les équations de ces taux sont développées à la section 5.7.

## 5.2 Bilans de matière

Afin de suivre l'évolution dans le temps des variables d'état du modèle, des bilans de matière sont effectués à partir des équations du schème réactionnel. Le bilan de matière pour une variable  $\xi$  prend la forme suivante:

$$\frac{d\xi}{dt} = K\phi(\xi) - D\xi + f(\xi) \quad 5.1$$

où  $\xi$  est la variable d'état du modèle,  $K$  le rendement,  $\phi(\xi)$  le taux de réaction,  $D$  le taux de dilution et  $f(\xi)$  le taux d'alimentation. Le volume de liquide dans le bioréacteur est modifié par l'échantillonnage et l'ajout de nutriments, le taux de dilution prend la forme suivante :

$$D = \frac{1}{V} \left( Q_{\text{Éch}} + \frac{dV}{dt} \right) \quad 5.2$$

$$\text{avec } \frac{dV}{dt} = V \sum_{n=1}^i \frac{f(\xi_n)}{\xi_{f,n}} - Q_{éch} \quad 5.3$$

où  $V$  est le volume total de culture (avec la biomasse),  $Q_{éch}$  le taux d'échantillonnage,  $f(\xi_n)$  le débit d'alimentation et  $\xi_{f,n}$  la concentration de  $\xi$  dans le débit d'alimentation.

Les variables qui sont pris en compte dans le modèle peuvent être regroupées sous trois catégories : les nutriments extracellulaires et intracellulaires ainsi que la biomasse (biomasse sèche et dénombrement cellulaire).

### 5.2.1 Bilans des nutriments extracellulaires

La concentration des nutriments extracellulaires des cultures est modifiée par la consommation des cellules et par les ajouts dans le milieu de culture. Dans le cas du glucose et du fructose, on ajoute un terme de génération qui provient de l'hydrolyse du sucrose. Les équations suivantes sont le bilan de l'équation 5.1 adapté pour les nutriments extracellulaires.

$$\text{Sucrose} \quad \frac{dS}{dt} = -\phi_{hydrolyse} X - DS + f_s \quad 5-4$$

$$\text{Glucose} \quad \frac{dG}{dt} = K_{stoichio} \phi_{hydrolyse} X - \phi_G X - DG + f_G \quad 5-5$$

$$\text{Fructose} \quad \frac{dF}{dt} = K_{stoichio} \phi_{hydrolyse} X - \phi_F X - DF + f_F \quad 5-6$$



$$\text{Nitrate} \quad \frac{dNO_3}{dt} = -\phi_{NO_3} X - DNO_3 + f_{NO_3} \quad 5-7$$

$$\text{Ammonium} \quad \frac{dNH_4}{dt} = -\phi_{NH_4} X - DNH_4 + f_{NH_4} \quad 5-8$$

$$\text{Phosphate} \quad \frac{dPO_4}{dt} = -\phi_{PO_4} X - DPO_4 + f_{PO_4} \quad 5-9$$

où  $\phi_n$  est le taux de consommation du nutriment  $n$  et  $f_n$ , son débit d'alimentation.  $K_{stochio}$  est une constante qui converti le sucrose hydrolysé en masse de glucose et fructose.

Le sucrose est consommé par hydrolyse dans le milieu extracellulaire. Le sucrose hydrolysé libère une molécule de glucose et de fructose, qui sont comptabilisés dans les termes d'alimentation  $f_G$  et  $f_F$ . Ces deux sucres sont également consommés du milieu extracellulaire par les cellules. Les sources d'azote et de phosphate extracellulaire sont absorbé par les cellules et des ajouts ponctuels ou continus sont fournis aux cultures en cuvette alimentée.

## 5.2.2 Bilans des nutriments intracellulaires

Le pool intracellulaire de phosphate dépend du taux d'absorption des cellules et de l'accroissement du dénombrement cellulaire. On suppose que la consommation de l'ion est entièrement due à l'accroissement du dénombrement cellulaire et que le métabolisme utilise le nitrate et l'ammonium en quantité égale. Lors de la révision de son modèle en 2000, Sirois suggère que le catabolisme du phosphate est plus intimement relié à la concentration cellulaire qu'à la biomasse sèche. Ainsi, le terme de consommation est basé sur le rendement en cellules. La variation du phosphate intracellulaire est décrit par :

Phosphate intracellulaire	$\frac{dPO_4^i}{dt} = \phi_{PO_4} - Y_{PO_4/C} \frac{1}{C} \frac{dC}{dt}$	5-10
---------------------------	---	------

### 5.2.3 Bilans de biomasse sèche et dénombrement cellulaire

Les paramètres qui quantifient les cellules sont la biomasse sèche et le dénombrement cellulaire. La vitesse de la croissance augmentent proportionnellement à la biomasse ou au nombre de cellules (effet autocatalytique, voir 5.1 dernier paragraphe) et à un taux de croissance  $\mu$  :

Biomasse sèche	$\frac{dX}{dt} = \mu_X X$	5-11
----------------	---------------------------	------

Dénombrement cellulaire	$\frac{dC}{dt} = \mu_C C$	5-12
-------------------------	---------------------------	------

Notons qu'il n'y a pas de terme de mortalité des cellules dans les équations. Le modèle proposé ne prédit donc pas la phase de mortalité de la courbe de croissance et son application s'arrête à la phase plateau de la courbe de croissance (section 2.4.1). Les équations des taux de croissance sont développées à la section 5.7.

## 5.3 Simulations numériques

Les équations différentielles développées à la section précédente forment un système de premier ordre qui doit être intégré afin de déterminer la valeur des variables d'état en fonction du temps. L'intégration numérique est la méthode de choix puisque le système est trop complexe pour être résolu de manière analytique. La méthode de Runge-Kutta d'ordre quatre (RK4) est populaire car elle donne des résultats précis avec un algorithme

relativement simple (Cash et Karp, 1990). Cependant, les modèles de systèmes biologiques peuvent parfois être des systèmes d'équations différentielles dits *stiffs* (Gupta, 1985). Ces systèmes sont souvent rencontrés lorsque certaines variables ont la propriété d'avoir des taux de variation qui changent rapidement, qui sont instables ou encore lorsque deux variables varient sur des échelles de temps complètement différentes. Selon Gupta, le concept de *stiffness* est difficile à définir précisément. Ce sont des équations différentielles pour lesquelles les méthodes d'intégration standards deviennent numériquement instables à moins que le pas de temps ne soit réduit à des valeurs extrêmement faibles. Toujours selon Gupta, la solution numérique d'un même système peut comporter des zones *stiffs* et d'autres *non stiff*s

Puisque la technique RK4 résout les systèmes sur des intervalles de temps fixe son utilisation en pratique est souvent impossible. Certaines parties de la solution demandent une résolution plus fine. Ainsi, les pas de temps doivent être réduits pour obtenir des solutions satisfaisantes, augmentant ainsi considérablement les temps de calcul. Afin de pallier à cette lacune, des algorithmes à pas de temps variables ont été développés afin d'obtenir plus de précision dans les zones *stiffs* de la solution (Gupta, 1985). Ces techniques utilisent des algorithmes plus raffinés qui ont des pas de temps variables en fonction de la précision exigée par la solution. De plus, elles combinent plusieurs méthodes. Pour une portion où le taux de variation est instable, des calculs plus précis (et complexes) sont effectués. Les temps de calcul sont ainsi optimisés.

Ces techniques sont appliquées à l'aide d'outils informatiques. Le logiciel matlab® comprend une librairie contenant diverses fonctions permettant d'appliquer ces méthodes. Ce logiciel est utilisé pour effectuer les simulation numériques du modèle. Deux fonctions ont été testées : ODE45 et ODE15s (résultats non montrés), comme le suggère la documentation de matlab®. La première est basée sur la méthode des ordres moyens (*medium order method*) et est adéquate pour des systèmes non *stiff*. La seconde utilise les formules de différentiation numérique (*numerical differentiation formulas*,

NDFs) et est applicable aux systèmes *stiffs*. L'utilisation de ODE45 c'est révélée beaucoup moins performante que ODE15s, nécessitant des temps de calculs considérables et générant des solutions moins précises. Les simulations effectuées utilisent donc ODE15s.

Les conditions initiales du système d'équation différentiel sont fournies par les données du premier échantillon d'une culture. La solution est ensuite comparée aux données expérimentales et l'erreurs d'estimation est calculée. Cette erreur est ensuite minimisée afin de déterminer les paramètres manquants du modèle.

### 5.3.1 Calculs d'erreur d'estimation du modèle

Les simulations sont effectuées en utilisant les données de plusieurs cultures. Chaque culture représente ainsi un test indépendant. L'erreur d'estimation est évaluée en comparant la solution du modèle aux données recueillies lors des cultures pour une ou plusieurs variables, selon le cas. Deux méthodes de calcul d'erreurs d'estimation sont utilisées afin d'apprécier la précision du modèle. L'erreur relative moyenne (ERM) donne une valeur en pourcentage de l'erreur moyenne d'estimation du modèle et est utilisée à titre qualitatif seulement. Le carré pondéré des erreurs (CPE) est utilisé comme critère de minimisation de l'erreur.

#### ERM

L'erreur relative est d'abord calculée pour chacune des cultures simulées :

$$e_k = \sum_{v=1}^W \left( \frac{\sum_{i=2}^j |v_{e,i} - v_{m,i}|}{\sum_{i=2}^j v_{m,i}} \right) \frac{1}{W} \quad 5-13$$

Où  $i$  est l'échantillon,  $j$  le nombre d'échantillons,  $k$  la culture,  $v_{e,i}$  et  $v_{m,i}$  sont respectivement les valeurs estimées et mesurées de l'échantillon  $i$ .  $W$  est le nombre de variables utilisées dans le calcul de l'erreur. On remarque que le premier échantillon de la culture n'est pas considéré ( $i=2$ ) puisque celui-ci est utilisé pour les conditions initiales du modèle. L'ERM est obtenu en faisant la moyenne des  $e_k$ .

$$e_{moy} = \frac{\sum_{k=1}^L e_k}{L} * 100 \quad 5-14$$

Où  $L$  est le nombre de cultures. La valeur en pourcentage obtenue permet une interprétation rapide de l'erreur d'estimation.

### CPE

Le CPE n'est pas utilisé à titre qualitatif, c'est le critère utilisé afin de minimiser l'erreur d'estimation du modèle. L'erreur d'estimation est pondérée par le carré moyen de la variable mesurée et par le nombre d'échantillons de la culture.

$$e_p^2 = \sum_{v=1}^W \left( \frac{1}{v_{m,moy}^2} \sum_{k=1}^L \frac{\sum_{i=2}^j (v_{e,i} - v_{m,i})^2}{j-1} \right) \quad 5-15$$

### **5.3.2 Minimisation de l'erreur d'estimation**

La valeur des constantes du modèle est estimée en minimisant l'erreur d'estimation (CPE). La tâche est considérable puisque le problème est multidimensionnel, plusieurs

paramètres sont résolus simultanément. De plus, le modèle est non linéaire et possède plusieurs minimums locaux. Pour ce type de problème, une technique itérative largement répandue en chimie, médecine et ingénierie est l'algorithme de Nelder-Mead (Lagarias et al., 1998). C'est une méthode d'optimisation dite directe puisqu'elle minimise une fonction scalaire de  $n$  variables sans avoir recours aux valeurs de sa dérivée.

Cette technique est disponible dans la fonction `fminsearch` de `matlab®`. Le CPE des variables est minimisé en faisant varier les paramètres du modèle. Les valeurs initiales des paramètres sont, autant que possible, basées sur des valeurs tirées de la littérature ou obtenues expérimentalement. Puisque le modèle comporte plusieurs paramètres, l'approche privilégiée pour les déterminer consiste à diviser ce dernier en plusieurs problèmes d'optimisation. L'absorption de chacun des nutriments est optimisée séparément en minimisant l'erreur d'estimation sur sa concentration et par la suite, les paramètres relatifs aux taux de croissance sont déterminés.

## **5.4 Cinétique d'absorption des sucres**

Les cellules utilisées lors de ce projet sont indifférenciées. Ce sont des cellules hétérotrophes qui n'ont pas la capacité de synthétiser des sucres par photosynthèse et une source externe doit être fournie.

Trois sucres sont considérés par le modèle, le sucrose, le glucose et le fructose. Le sucrose est consommé suivant la cinétique d'hydrolyse des invertases acides présentes sur les membranes des cellules végétales. L'absorption du glucose et du fructose par les cellules suit une cinétique d'absorption apparente qui comprend l'effet de tous les types de transporteurs d'hexose des cellules.

### 5.4.1 Hydrolyse du sucrose

Le modèle d'hydrolyse du sucrose proposé s'inspire de la cinétique de l'activité des invertases acides (figure 2-5). L'activité de ces dernières dépend de la concentration de sucrose selon une cinétique de Michaelis-Menten (section 3.3.2.1) pour des concentrations inférieures à 40 g/L. Les valeurs de  $K_m$  des invertases acides sont relativement faibles (0.3 à 1.0 g/L-Black et al., 1995) comparativement aux concentrations de sucrose mesurées lors des cultures. Le sucrose est rapidement dégradé après l'inoculation des cultures mais l'échantillonnage est fait sur une base quotidienne. Généralement, le sucrose est épuisé en moins de 50 heures (figure 5-2) pour une culture en flacon avec 30 g/L de sucrose à l'inoculation. Dans ces conditions, les plus petites concentrations mesurées sont entre 2 et 5 g/L. L'absence de données dans l'intervalle où l'activité des invertases est sensible à la concentration en sucrose rend impossible la détermination précise de la constante  $K_{Hyd}$ . On peut cependant affirmer que la diminution de la vitesse d'hydrolyse à des concentrations faibles n'a pas de répercussions majeures sur la précision du modèle.

L'autre paramètre à déterminer est la vitesse maximale d'hydrolyse ( $V_{Hydmax}$ ). Sa valeur est estimée avec les données expérimentales disponibles. Puisque la concentration d'invertase n'est pas mesurée, une base en biomasse sèche est utilisée. L'hypothèse suivante doit cependant être émise: la quantité d'invertase est constante pour une masse cellulaire donnée. Ainsi, la vitesse  $V_{Hydmax}$  représente la masse de sucrose hydrolysé en une heure par un gramme de biomasse sèche. La vitesse d'hydrolyse du sucrose est donnée par :

$$\phi_{Hyd} = -V_{HydMax} \left( \frac{S}{S + K_{Hyd}} \right) X \quad 5-16$$

Les valeurs de  $V_{Hydmax}$  et de  $K_{Hyd}$  sont calculées par minimisation de  $e_p^2$  entre les concentrations en sucrose expérimentales et le modèle selon la technique exposée à la section 5.3.1. Des cultures en flacons de 1 litre sont utilisées.

**Tableau 5-1 :** Valeur des paramètres de la vitesse d'hydrolyse.

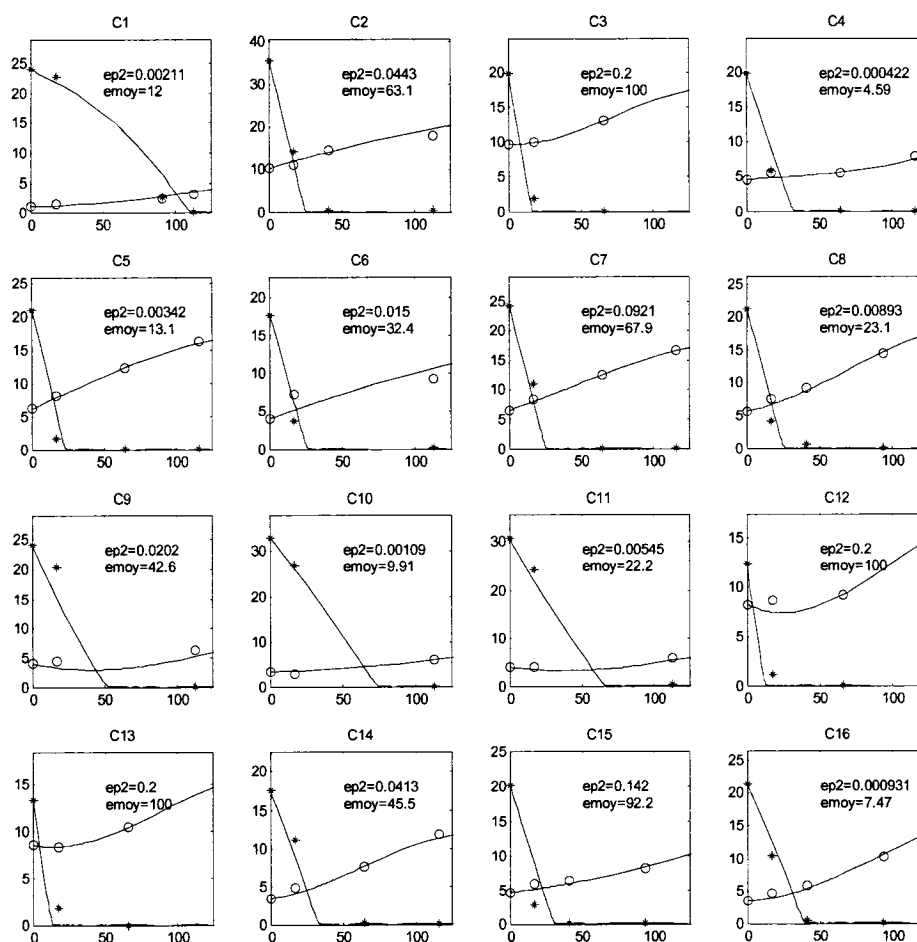
Paramètres	
$V_{HydMax}$ (g/gDW/h)	0.183
$K_{Hyd}$ (g/L)	0.36

La vitesse d'hydrolyse du sucrose maximale déterminée est de 0.183 g/gDW/h. Les valeurs de  $K_{Hyd}$  répertoriées dans la littérature se situent entre 0.3 et 1.0 g/L. La minimisation détermine une valeur optimale de 0.36 g/L. Seul les échantillons ayant une concentration en sucrose supérieures à 1 g/L étaient considérés dans les calculs de  $e_p^2$  et de  $e_{moy}$ . De cette manière, on élimine les échantillons à concentration nulle des calculs et on limite l'effet des erreurs de mesure sur le critère d'optimisation.

La figure 5.3 présente les cultures utilisées pour la détermination de la vitesse d'hydrolyse maximale. L'estimation du modèle d'hydrolyse (lignes) est superposée aux données d'échantillonnage. La biomasse sèche est, pour le moment, modélisée par un polynôme de degré 3. L'utilisation d'un polynôme permet de déterminer les paramètres d'absorption sans avoir ceux des taux de croissance.



Concentration de sucre(g/L) en fonction du temps(h)

**Figure 5-3 :** Modèle d'hydrolyse du sucrose superposé à 16 cultures en flacons de 1L.

\*-concentration en sucre mesurée, ○ -Concentration en biomasse sèche mesurée

Les simulations permettent d'obtenir un bon compromis pour satisfaire les cultures utilisées. En effet, pour certaines cultures, le modèle surestime la concentration en sucre (C4, C5, C6, C15, C16) alors que pour les autres, il la sous-estime. L'erreur relative semble élevée pour certaines cultures. Mis à part C1, les cultures n'ont qu'un seul échantillon qui entre dans le calcul d'erreur. Les cultures C12 et C13 ont une

erreur relative de 100% parce que le modèle prédit que la concentration est nulle alors qu'il en reste environ 2-3 g/L. L'obtention d'une cinétique plus sensible nécessiterait des expérimentations avec des échantillonnages plus fréquents en début de culture et avec une biomasse plus faible à l'inoculation afin d'obtenir plus de détails à de faibles concentrations. La culture C1 est celle dont la biomasse initiale est la plus faible. Pour les autres cultures, la biomasse est telle que les profils sont linéaires. Puisque le sucrose est rapidement hydrolysé et n'est jamais ajouté au milieu pendant les cultures effectuées dans ce projet, la cinétique déterminée est jugée satisfaisante..

L'hydrolyse d'une molécule de sucrose libère une molécule de fructose et de glucose dans le milieu de culture. Ayant déterminé la cinétique de cette réaction, on passe aux vitesses d'absorption de ces deux hexoses.

#### 5.4.2 Absorption du glucose et du fructose

Les cinétiques d'absorption proposées s'inspirent de celles des transporteurs d'hexoses membranaires des cellules végétales (section 2.3.2.2). Quatre cultures en flacons de 1 litres contenant un seul sucre sont utilisées afin de déterminer les paramètres d'une cinétique de Michaelis-Menten :

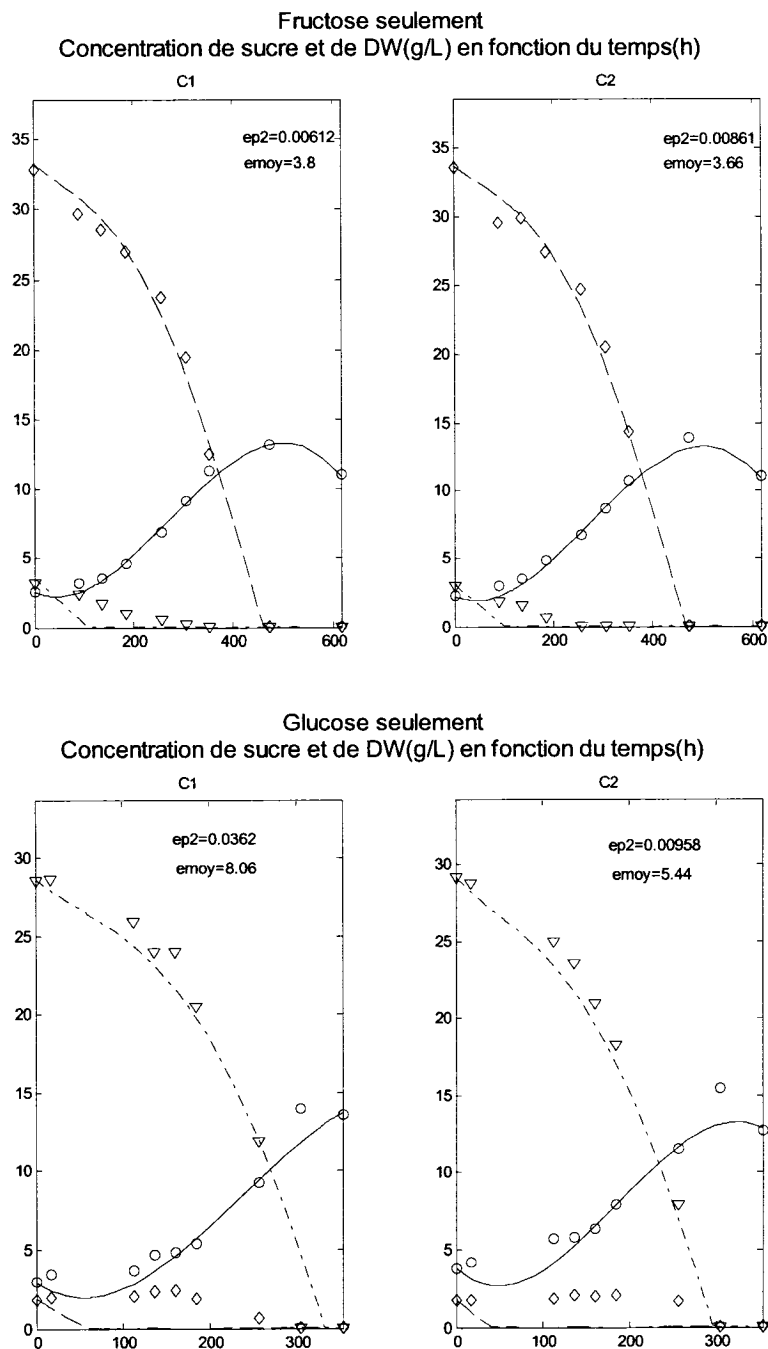
$$\phi_G = -V_{G_{Max}} \left( \frac{G}{G + K_G} \right) X \quad 5-17$$

et

$$\phi_F = -V_{F_{Max}} \left( \frac{F}{F + K_F} \right) X \quad 5-18$$

L'erreur d'estimation du modèle est calculée sur la concentration des sucres dans le milieu de culture. Les paramètres sont déterminés en minimisant cette erreur. La figure 5.4 montrent les simulations des cultures utilisées pour la minimisation. Les données expérimentales sont superposées aux profils des cinétiques d'absorption

(équations 5.19 et 5.20). La biomasse est pour l'instant modélisée par un polynôme de degré 3. Les figures du haut montrent des cultures avec seulement du fructose dans le milieu de culture. La prédiction du modèle est fidèle aux données expérimentales. Pour les cultures avec glucose (5.4, figures inférieures), le modèle sous estime légèrement la concentration. On remarque que dans les cultures, un résidu de l'autre sucre était présent à l'inoculation (environ 2 g/L). Le résidu de glucose présent dans les cultures avec fructose est absorbé linéairement alors que le fructose (figures du bas) demeure constant pendant les 200 premières heures. Ces résidus sont cependant totalement épuisés après 300 heures. Les cinétiques proposées ne tiennent pas compte de cette subtilité. Cette observation permet de poser l'hypothèse que les vitesses d'absorption du glucose et du fructose dépendent des deux sucres.



**Figure 5-4 :** Modèle d'absorption du fructose et du glucose sans inhibition.

○ -Concentration en biomasse sèche mesurée, ▽ - Concentration en glucose mesurée, ◇ - Concentration en fructose mesurée. Ligne pleine – Biomasse sèche estimée(polynôme de degré 3), Ligne pointillée discontinue – Glucose estimé, Ligne pointillée continue – Fructose estimé.

Afin d'améliorer les cinétiques d'absorption, celles-ci sont remplacées par des cinétiques à inhibition compétitive.

$$\phi_G = -V_{G_{Max}} \left( \frac{G}{G + K_G \left( 1 + \frac{F}{K_{iF}} \right)} \right) X \quad 5-19$$

et

$$\phi_F = -V_{F_{Max}} \left( \frac{F}{F + K_F \left( 1 + \frac{G}{K_{iG}} \right)} \right) X \quad 5-20$$

Avec cette nouvelle forme, la présence de glucose ralentit l'absorption du fructose et vice-versa. Les quatre cultures précédentes sont utilisées et on ajoute quatre cultures contenant du sucrose. Ces cultures sont simulées en introduisant les bilans de matière du glucose, du fructose et du sucrose dans le modèle. On vérifie du même coup les bilans de matière relatifs aux sucres développés à la section 5.2.1. La biomasse est toujours modélisée par un polynôme de degré 3. L'erreur d'estimation minimisée est l'addition de celle du glucose et du fructose

**Tableau 5-2 : Valeur des paramètres de l'absorption du glucose et du fructose.**

Paramètres			
$V_{G_{Max}}$ (g/gDW/h)	0.014	$V_{F_{Max}}$ (g/gDW/h)	0.011
$K_G$ (g/L)	0.04	$K_F$ (g/L)	0.03
$K_{iF}$ (g/L)	0.19	$K_{iG}$ (g/L)	0.023

L'erreur relative moyenne est de 7.5% pour toutes les données expérimentales de glucose et de fructose. Une recherche dans la littérature permet de recenser une étude utilisant le même modèle d'absorption pour l'espèce *P. vulgaris* (Botha et al. 1998). La

valeur des constantes qu'obtiennent les auteurs sont :  $K_G = 0.24 \text{ g/L}$ ,  $K_{iF} = 1.8 \text{ g/L}$ ,  $K_F = 0.97 \text{ g/L}$  et  $K_{iG} = 0.2 \text{ g/L}$ .

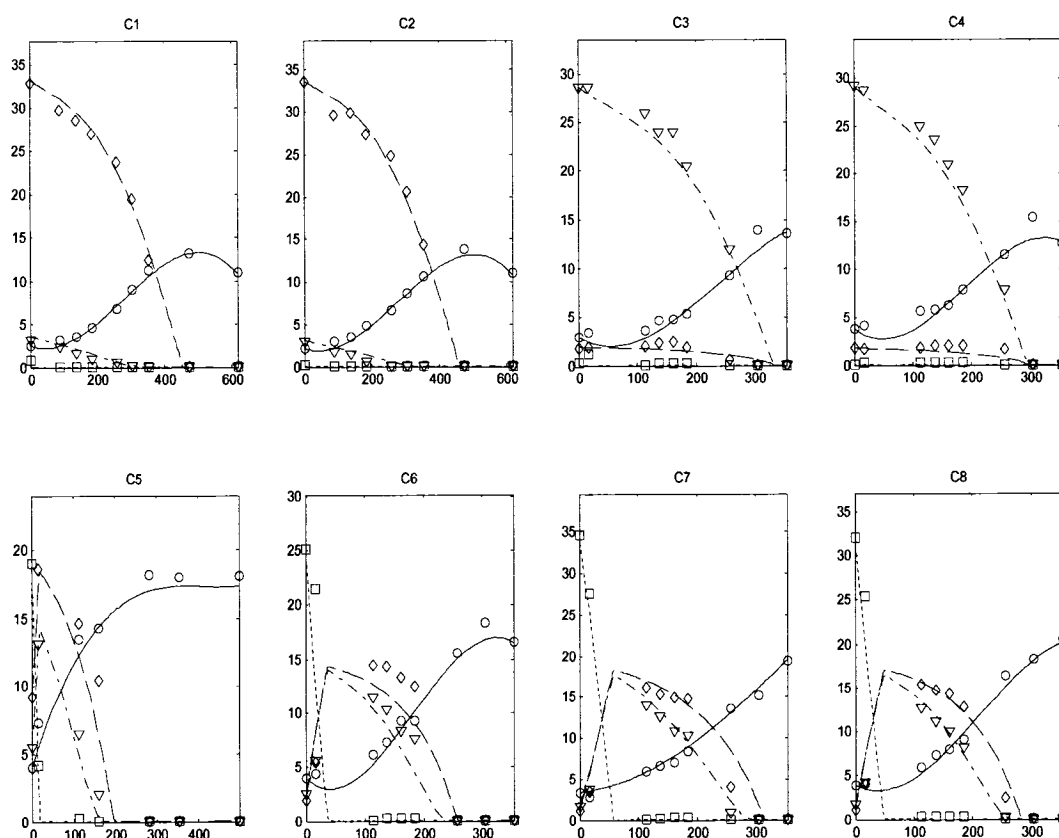
Les  $K_F$  et  $K_G$  obtenus sont un ordre de grandeur plus faible que celle proposée par Botha. Cependant, le manque de données à des concentrations proche de  $K_F$  et  $K_G$  ( $0.03 \text{ g/L}$ ) ne permet pas de les déterminer précisément. Les valeurs trouvées sont celles qui minimisent l'erreur des 8 cultures utilisées. Les valeurs de  $K_G$  et  $K_F$  sont petites comparativement aux concentrations utilisées en pratique et les vitesses d'absorption sont des fonctions échelons si on ne considère pas l'effet d'inhibition.

Les constantes d'affinité ( $K_{iG}$  et  $K_{iF}$ ) sont dix fois plus faibles que celles de Botha. Cependant, le rapport  $K_{iF}/K_{iG}$  est comparable. L'effet du fructose sur le transport du glucose est dix fois plus faible que celui du fructose sur le glucose. À la lumière de ces résultats, on peut conclure que la cinétique de transport des hexoses de *C. roseus* est semblable à celle de *P. vulgaris*. En effet, Botha conclut que l'absorption du glucose est inhibée par le fructose et vice-versa. Des études sur les transporteurs d'hexoses (section 2.3.2.2) mentionnent qu'un seul transporteur effectue le transport des hexoses. Le transport du glucose est favorisé par le transporteur. Les taux d'absorption différents résultent d'une compétition pour le même transporteur.

La figure 5.5 présente les résultats des 8 cultures utilisées pour la détermination des paramètres. Les cultures C1 à C4 sont les mêmes que celles présentées à la figure 5.4. Les nouvelles cinétiques d'absorption permettent d'améliorer grandement l'estimation pour les sucres résiduels. Le résidu de glucose présent dans les cultures C1 et C2 ainsi que le résidu de fructose dans C3 et C4 sont désormais adéquatement modélisés. Le modèle prédit également les profils de concentration pour les cultures avec sucrose (C5 à C8). L'augmentation initiale de la concentration de glucose et de fructose est due à l'hydrolyse du sucrose qui est plus rapide que les taux d'absorption. Une fois le sucrose complètement hydrolysé, les hexoses sont absorbés et les concentrations

diminuent. Le glucose est toujours absorbé plus rapidement que le fructose. Ce profil est typique des suspensions cellulaires de plusieurs espèces végétales dont *M. ogiformis* (Holme et al. 1998), *M. elliptica* (Mohd et al. 2000) et *P. vulgaris* (Botha et al. 1998). Des cultures en flacons de racines transformées de *C. roseus* (Badrah et Shanks 1997) ont également ce comportement.

Concentration de sucre et de DW(g/L) en fonction du temps(h)



**Figure 5-5 :** Modèle d'absorption des sucres avec inhibition.

○ -Concentration en biomasse sèche mesurée, □- Concentration en sucrose mesurée, ▽ - Concentration en glucose mesurée, ◇ - Concentration en fructose mesurée. Ligne pointillée- Sucrose estimé, Ligne pleine – Biomasse sèche estimée, Traits et pointillés – Glucose estimé, Traits – Fructose estimé.

## 5.5 Cinétiques d'absorption des Composés azotés

Tel que mentionné à la section 2.3.1, le transport membranaire des ions est un processus complexe qui est régulé par plusieurs facteurs. Certains ions sont transportés par plusieurs types de transporteurs (par exemple  $\text{PO}_4$ ,  $\text{NO}_3$  et  $\text{NH}_4$ ) ce qui permet une meilleure capacité d'adaptation selon la disponibilité de ceux-ci. La cellule végétale est en compétition avec divers facteurs biotiques et abiotiques tel l'érosion, le ruissellement, les micro-organismes et les autres végétaux afin d'assurer sa survie. Le flux à travers les transporteurs ainsi que leur expression au niveau génétique dépend de multiples variables physico-chimiques.

### 5.5.1 Cinétique d'absorption du $\text{NO}_3$

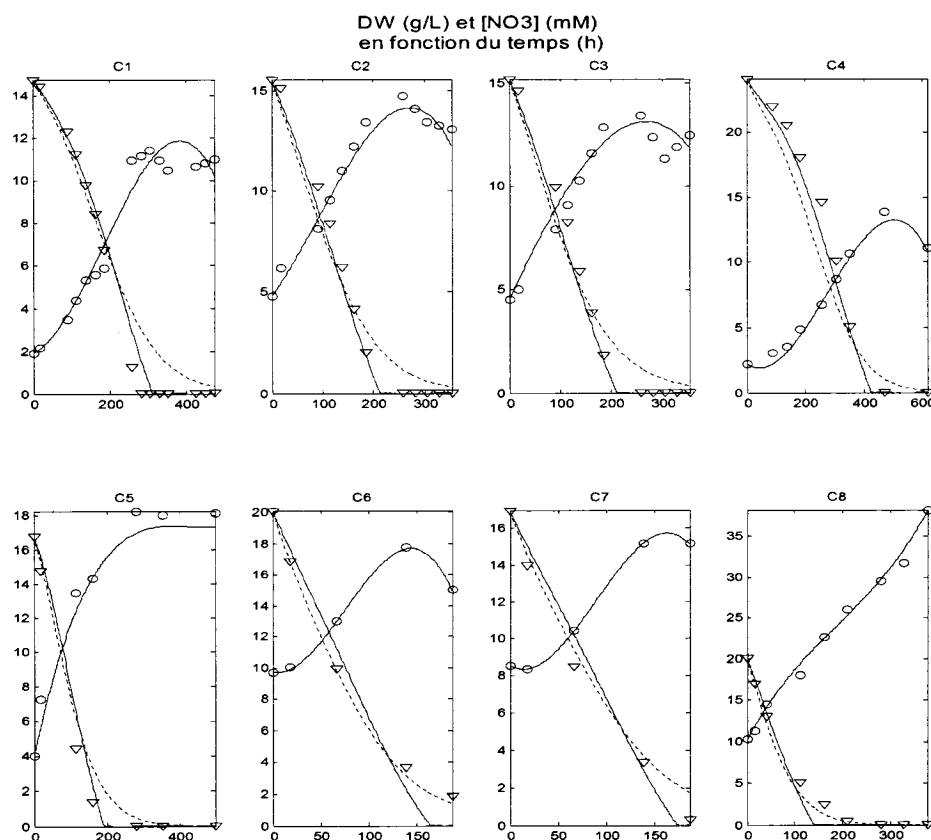
Le système d'absorption du nitrate est typiquement composé de transporteurs à haute affinité (HATS, *high affinity transport system*) et à basse affinité (LATS, *Low affinity transport system*). Le premier type de transporteur sature à des concentrations de l'ordre de 1mM (Chrispeels, 1999). La majorité du transport à des concentrations supérieures à 1mM est assurée par les LATS. La cinétique observée avec plusieurs espèces est linéaire et non saturante à des concentrations aussi élevées que 50mM (Crawford et al., 1998)

Sirois utilise une cinétique linéaire pour l'absorption du nitrate et néglige la contribution des HATS. Une telle simplification est satisfaisante à des concentrations relativement élevées. Cependant, plus la concentration approche zéro, plus la solution dévie de la réalité. L'étude des flux de nitrate d'une suspension cellulaire de *Nicotiana tabacum* (Zhang et al. 1993) démontre que l'effet des HATS est non négligeable. Un terme est ajouté à l'équation proposée par Sirois afin d'en tenir compte. Le système à basse affinité est simplifié à une équation de Michaelis-Menten. Le paramètre  $a_{\text{NO}_3}$  représente la pente de la vitesse d'absorption des LATS.



$$\phi_{NO_3} = -a_{NO_3}[NO_3]X - V_{NO_3} \frac{[NO_3]}{k_{NO_3} + [NO_3]} X \quad 5-21$$

Les paramètres de cette équation sont déterminés en minimisant l'erreur d'estimation du modèle sur huit cultures en flacon de 1L.



**Figure 5-6 :** Modèle d'absorption du nitrate appliqué à 8 cultures en flacons de 1L.  
 O -Concentration de biomasse sèche mesurée, ▽- Concentration de nitrate mesurée.  
 Ligne pleine – Biomasse sèche estimé (polynôme) et nitrate avec transport à basse affinité  
 Ligne pointillée – nitrate estimé sans transport à basse affinité.

On remarque d'abord la différence qu'apporte l'introduction du terme de basse affinité. Les deux modèles retournent des résultats comparables pour des concentrations supérieures à 5 mM. Par contre, l'estimation est plus précise avec le terme de basse affinité. Le modèle proposé réussit à prédire le temps auquel le nitrate est complètement épuisé plus précisément pour six cultures (sauf C6 et C8). En examinant la culture C6, on remarque que le profil de biomasse à 150 heures est dans la phase de mortalité ce qui explique la diminution de la vitesse d'absorption.

Le terme de haute affinité contribue peu à l'absorption du nitrate en début de culture puisque que la biomasse est faible. En cours de culture, le terme devient de plus en plus important à mesure que la biomasse augmente. De plus, l'absorption à basse affinité est directement proportionnelle à la concentration en nitrate, augmentant la fraction du transport attribuable aux HATS pour des concentrations plus faibles.

Les paramètres obtenus par minimisation de l'erreur sont présentés dans le tableau 5.3. La valeur de  $k_{NO_3}$  de 0.1 mM n'est pas une estimation précise due au manque de mesure dans cet ordre de grandeur. Cependant, elle est plausible lorsque comparée à celles recensées dans la littérature (0.05 à 0.9 mM) (Garnett et al. 2003). Ce paramètre n'a pas un grand impact sur la qualité du modèle. Lorsque la concentration atteint la zone où son effet est perceptible, le nitrate rapidement épuisé. Le terme représentant les LATS devient une fonction échelon à l'échelle de temps du système.

**Tableau 5-3 : Paramètres d'absorption du nitrate**

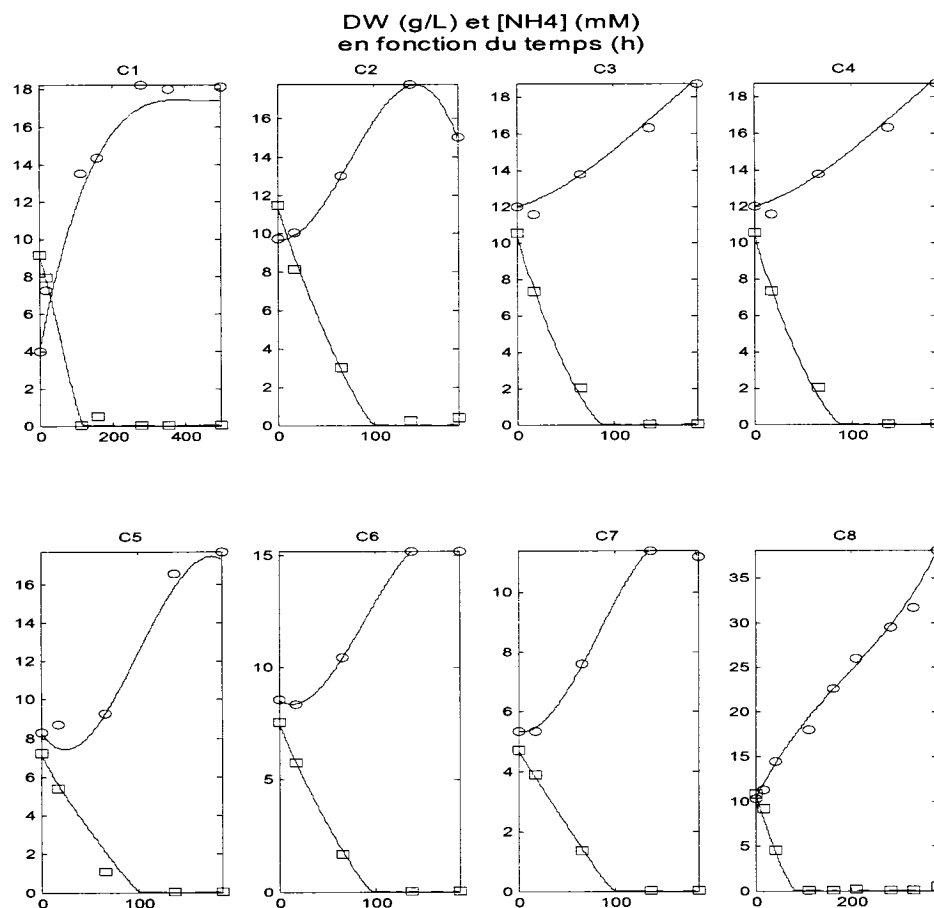
Paramètres	
$a_{NO_3}$ (L/gDW/h)	0.0007
$V_{NO_3}$ (mmol/gDW/h)	0.004
$k_{NO_3}$ (mM)	0.1

### 5.5.2 Cinétique d'absorption du $NH_4$

L'absorption de l'ammonium a un comportement similaire au nitrate pour des racines de riz (Wang et al, 1993), de maïs (Becking, 1956), de seigle (Lycklama, 1963) et de persil (Bloom et Chapin, 1981). Ainsi, la même équation que pour le transport nitrate est utilisée.

$$\phi_{NH_4} = -a_{NH_4}[NH_4]X - V_{NH_4} \frac{[NH_4]}{k_{NH_4} + [NH_4]} X \quad 5-22$$

Les paramètres sont toujours déterminés en minimisant l'erreur d'estimation du modèle à l'aide de huit cultures. Les résultats obtenus sont présentés à la figure suivante.



**Figure 5-7 :** Modèle d'absorption de l'ammonium.

○ -Concentration de biomasse sèche mesurée, □- Concentration d'ammonium mesurée.

Lignes pleines – Biomasse sèche(polynôme) et ammonium estimés.

Les vitesses d'absorption maximales sont supérieures à celles obtenues pour le nitrate. La pente  $a$  est plus élevée ( $a_{\text{NH}_4}=0.0025$  et  $a_{\text{NO}_3}=0.0007$ ) et  $V_{\text{NH}_4}$  est légèrement supérieur. Cette particularité est bien documentée dans la littérature (Coruzzi, 2001) et est régulièrement observée avec la plupart des espèces utilisées chez phytobiotech inc.

**Tableau 5-4 : Paramètres d'absorption de l'ammonium**

Paramètre	NH <sub>4</sub>
$a_{\text{NH}_4}(\text{L/gDW/h})$	0.0025
$V_{\text{NH}_4}(\text{mmol/gDW/h})$	0.006
$K_{\text{NH}_4}(\text{mM})$	0.1

## 5.6 Cinétique d'absorption du PO<sub>4</sub>

Les systèmes de transport de phosphate des végétaux ont la particularité de saturer à basse concentration lorsqu'on les comparent à ceux des ions azotés. Les végétaux ont évolués de façon à pouvoir extraire cet ion du sol. Sa concentration y est rarement supérieure à 10  $\mu\text{M}$  (Schachtman et al., 1998). On distingue toujours deux phases, haute et basse affinité. La composante à haute affinité a un  $k_m$  de 3 à 7  $\mu\text{M}$  alors que le système constitutif à basse affinité est de 50 à 330  $\mu\text{M}$  (Schachtman et al., 1998). Puisque le matériel disponible ne permet pas d'effectuer des mesures précises dans cette gamme de concentrations et que le modèle ne nécessite pas une telle précision, les paramètres sont estimés avec les données disponibles dans la littérature.

Pour une culture en cuvette typique de ce projet, 1 mM de PO<sub>4</sub> est fournie à l'inoculation. Des quantités qui varient entre 0.1 et 0.5 mM sont ajoutées ponctuellement en cours de culture pour les cuvettes alimentées. Ce phosphate est rapidement épuisé (moins de 18 heures). La cinétique proposée est une équation de Michaelis- Menten. La valeur de  $K_{\text{PO}_4}$  est fixée à 0.33 mM (Schachtman et al., 1998) en utilisant les données de la littérature pour les LATS de phosphate. Notons que pour un modèle identique, appliqué à une suspension cellulaire de *C. cardunculus* (Cabral et al., 2000), la valeur de  $K_m$  obtenue était de 2.73 mM pour un  $V_{\text{PO}_4}$  de 0.028 mmol/gDW/h. Cependant, ces paramètres étaient déterminés par minimisation de l'erreur d'estimation sur une seule culture et n'était comparé à aucune référence. Sirois (Sirois, 1997) propose également un cinétique à taux constant. La vitesse maximale

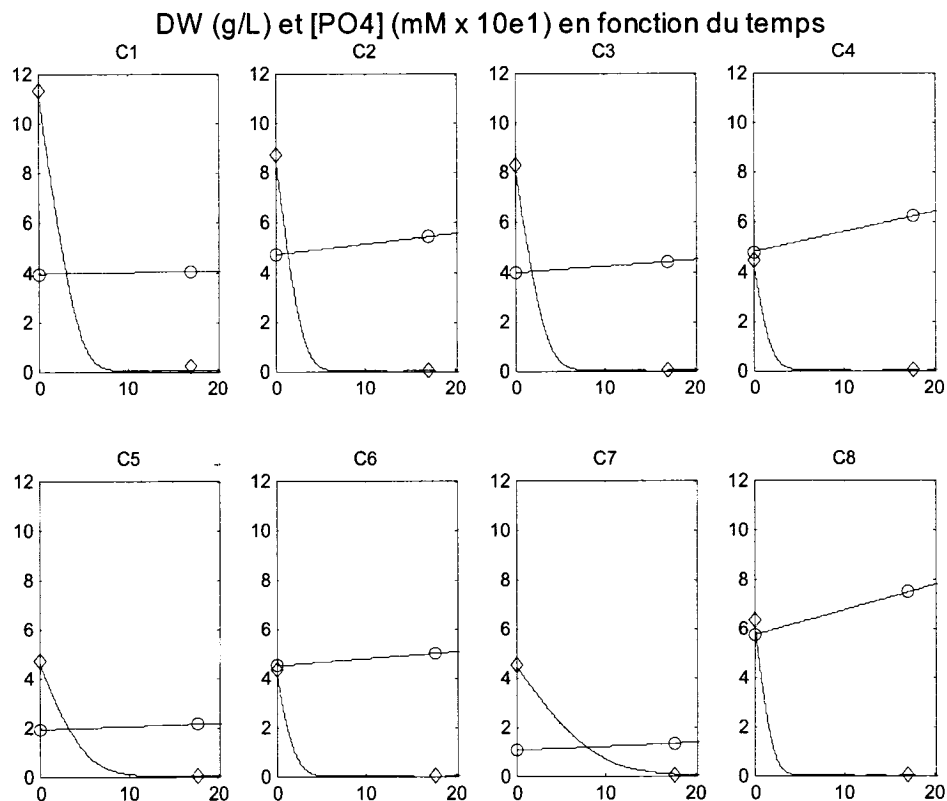
d'absorption est déterminée en utilisant huit cultures. Cependant, avec les données disponibles, seulement les deux premiers échantillonnages sont utiles. Le premier donne la concentration initiale. Le deuxième est toujours nul et utilisé afin de valider si la vitesse d'absorption fixée est suffisamment élevée.

$$\phi_{PO_4} = V_{PO_4} \frac{[PO_4]}{K_{PO_4} + [PO_4]} X \quad 5-23$$

**Tableau 5-5 : Paramètres d'absorption du phosphate**

Paramètres	
$V_{PO_4}$ (mmol/gDW/h)	1.8
$K$ (mM)	0.33

La vitesse maximale ( $V_{PO_4}$ ) est suffisamment élevée pour que le phosphate soit épuisé au premier échantillon (18 heures) pour les huit cultures. La culture la plus intéressante dans ce cas est C7. Ayant une biomasse initiale plus faible, la valeur du paramètre est déterminée par cette culture. Avec les données utilisées, on peut poser l'hypothèse que la valeur réelle de  $V_{PO_4}$  est égale ou supérieure à 1.8 mmol/gDW/h.



**Figure 5-8 :** Modèle d'absorption du phosphate.

○ -Concentration de biomasse sèche mesurée, ◇ - Concentration de phosphate mesurée.  
Ligne pleine – Biomasse sèche(polynôme) et phosphate estimés.

## 5.7 Taux de croissance et de prolifération cellulaire

Les équations des taux de croissance proposées par Sirois sont adaptées à *C. roseus*. Avec l'information obtenue des études de croissance (section 4) et ayant déterminé les cinétiques d'absorption, les paramètres spécifiques aux taux de croissance et de prolifération sont déterminés.

$$\mu_X = \mu_{X_{\max}} \underbrace{\left( \frac{G+F}{K_{X,CHO} + G+F} \right)}_{\text{Michaelis-Menten}} \underbrace{\left( \frac{N_T}{K_{X,N_T} + N_T} \right)}_{\text{Échelon}} \underbrace{\left( \frac{PO_{4i}}{K_{X,PO_4} + PO_{4i}} \right)}_{\text{Inhibition}} \left( \frac{K_{X,NH_4,1}}{K_{X,NH_4,1} + NH_4^{K_{X,NH_4,2}}} \right) \quad 5-24$$

$$\mu_C = \mu_{C_{\max}} \underbrace{\left( \frac{CHO}{K_{C,CHO} + CHO} \right)}_{\text{Michaelis-Menten}} \underbrace{\left( \frac{N_T}{K_{C,N_T} + N_T} \right)}_{\text{Échelon}} \underbrace{\left( \frac{PO_{4i}}{K_{C,PO_4} + PO_{4i}} \right)}_{\text{Inhibition}} \left( \frac{K_{C,NH_4,1}}{K_{C,NH_4,1} + NH_4^{K_{C,NH_4,2}}} \right) \quad 5-25$$

L'étude des cinétiques de croissance montrent que les taux de croissance variaient en fonction de la concentration extracellulaire en sucres (section 4.2.3), les premiers termes des équations sont des cinétiques de Michaelis-Menten. La valeur initiale des  $K_{CHO}$  est fixée par les valeurs préliminaires déterminées à la section 4.2.3. Dans le cas des ions azotés et du phosphate, les études de croissance ne permettent pas de vérifier que la concentration a un effet sur les taux de croissance. Comme dans le modèle de Sirois (Sirois, 2000), les deuxième et troisième termes des équations sont des fonctions échelons et servent à provoquer un arrêt de la croissance si un de ces ion est épuisé. Les derniers termes modélisent l'effet d'inhibition de la croissance par l'ammonium observée à la section 4.3.3.3. Les constantes d'inhibition initiales sont de l'ordre de grandeur de celles de Sirois et ajustées manuellement avant des simulations préalables. Les taux de croissance maximaux initiaux sont également estimés manuellement. Les paramètres déterminés par simulations numériques sont les  $\mu_{\max}$ , les  $K_{CHO}$  ainsi que les constantes d'inhibition de l'ammonium  $K_{X,NH_4,1}$ ,  $K_{X,NH_4,2}$ ,  $K_{C,NH_4,1}$  et  $K_{C,NH_4,2}$ . Les paramètres obtenus par la minimisation de l'erreur d'estimation du modèle sur la biomasse et le dénombrement cellulaire sont présentés au tableau 5.6.

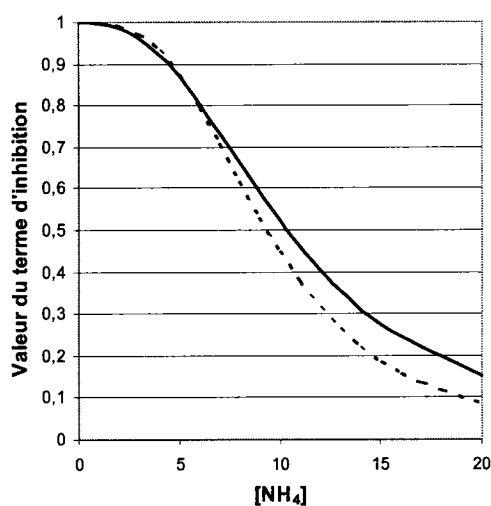


**Tableau 5-6** : Paramètres de taux de croissance et de prolifération cellulaire

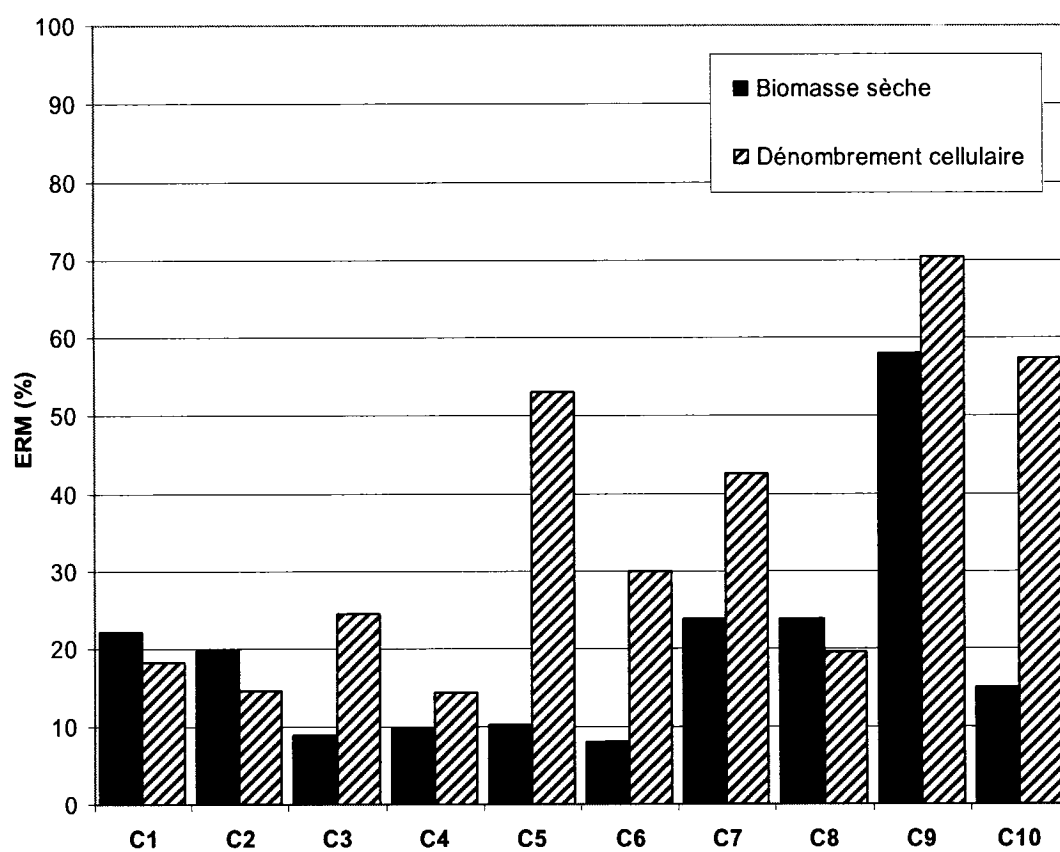
Paramètre	Valeur	Paramètre	Valeur
$\mu_{Xmax}$	0.0095 h <sup>-1</sup>	$\mu_{Cmax}$	0.013 h <sup>-1</sup>
$K_{X,CHO}$	3.8 gL <sup>-1</sup>	$K_{C,CHO}$	6 gL <sup>-1</sup>
$K_{X,Nt}^*$	0.01 mM	$K_{C,Nt}^*$	0.01 mM
$K_{X,PO4}^*$	0.01 mM	$K_{C,PO4}^*$	0.01 mM
$K_{X,NH4,1}$	435 mM	$K_{C,NH4,1}$	1022 mM
$K_{X,NH4,2}$	2.6	$K_{C,NH4,2}$	3.1

\* : Fonction échelon

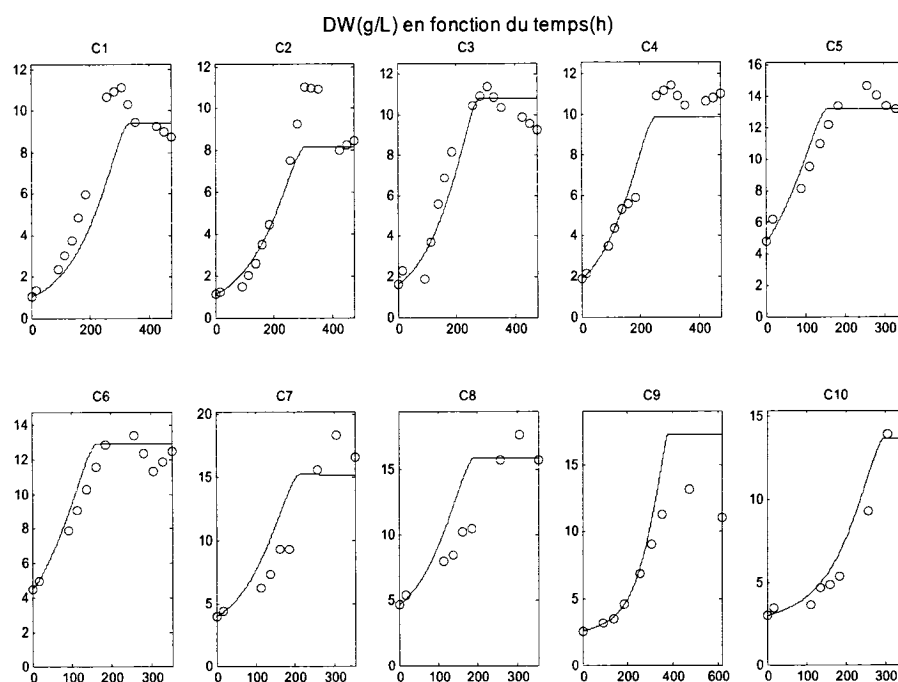
La figure 5.9 montre la valeur des termes d'inhibition des taux de croissance en fonction de la concentration en ammonium. On remarque qu'avec les constantes déterminées ( $K_{X,NH4,1}$ ,  $K_{X,NH4,2}$ ,  $K_{C,NH4,1}$  et  $K_{C,NH4,2}$ ) la croissance de la biomasse sèche et de la concentration cellulaire est rapidement ralentie à des concentrations au-delà de 5 mM de  $NH_4$  dans le milieu de culture. La forme de l'équation utilisée fait en sorte que même à des concentrations faibles d'ammonium, une inhibition est prédite par le modèle (par exemple environ 90% de la vitesse maximale à 5mM). En réalité, aucun effet n'est observé sur les suspensions à des concentrations inférieures à 10mM (section 4.3.3.1). Cette divergence est absorbée dans la valeur déterminée de  $\mu_{Xmax}$  et  $\mu_{Cmax}$

**Figure 5-9** : Valeur du terme d'inhibition des taux de croissance en fonction de la concentration en ammonium. Ligne pleine- $\mu_X$ , ligne pointillée- $\mu_C$ .

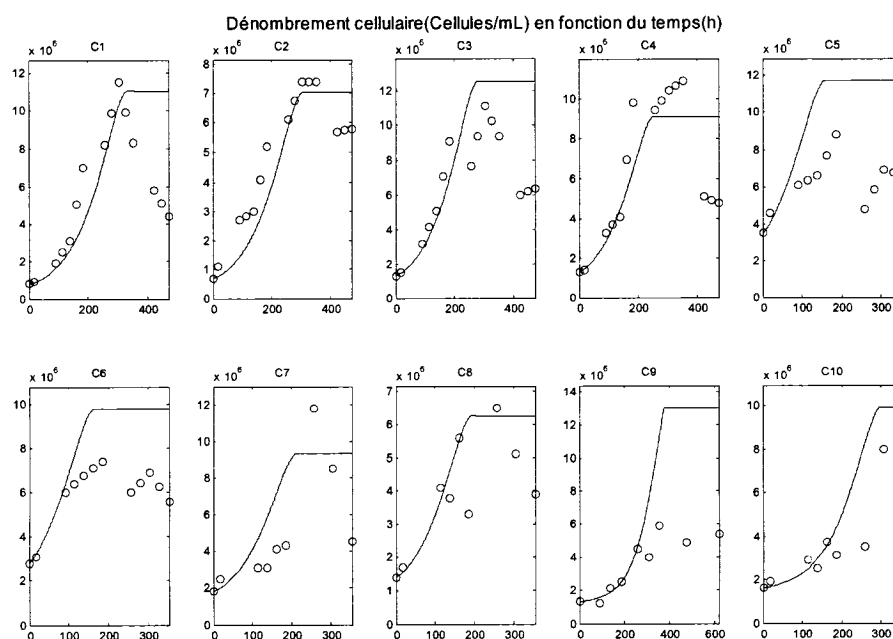
Les paramètres du tableau 5.6 sont déterminés en minimisant l'erreur d'estimation du modèle de dix cultures en flacons de 1L. Ces cultures sont sélectionnées de façon à couvrir des conditions expérimentales diverses. La concentration d'ammonium est particulièrement d'intérêt puisque les paramètres d'inhibition ne sont pas connus et la valeur initiale n'est pas évaluée expérimentalement. Les cultures C1 à C6 sont inoculées dans un milieu contenant peu d'ammonium (environ 2mM) alors que les autres en contiennent entre 8 et 20 mM. L'erreur relative moyenne (ERM) d'estimation de la biomasse sèche est de 16% alors qu'elle est de 30 % pour le dénombrement cellulaire. Les figures suivantes montrent l'erreur d'estimation (figure 5.10) ainsi que les profils de biomasse sèche (figure 5.11) et du dénombrement cellulaire (figure 5.12) pour les dix cultures. Les données complètes de simulation sont disponibles à l'annexe G.



**Figure 5-10 :** Erreur relative moyenne d'estimation du modèle sur la biomasse sèche et le dénombrement cellulaire.



**Figure 5-11 : Modélisation de la biomasse sèche de 10 cultures en flacons.**



**Figure 5-12 : Modélisation du dénombrement cellulaire de 10 cultures en flacons..**

Le modèle prédit la biomasse sèche avec une erreur entre 10 et 26 % alors que l'estimation se situe entre 14 et 70% pour le dénombrement cellulaire. La meilleure performance du modèle pour la biomasse sèche s'explique en partie par le fait que la méthode de mesure du dénombrement cellulaire est moins précise et plus variable. Plus de manipulations de l'échantillon sont nécessaires et une certaine subjectivité subsiste lors du décompte manuel, particulièrement lorsque la suspension contient des agrégats cellulaires. La formation d'agrégats est d'ailleurs particulièrement importante pour cette lignée cellulaire vers la fin des cultures en cuvée, lorsque les concentrations en nutriments deviennent faibles.

L'erreur d'estimation est attribuable à divers facteurs qui ne sont pas considérés par le modèle. La condition de l'inoculum, les gaz dissous, la disponibilité des micronutriments et des vitamines. Le fait que les cellules soient des organismes vivants en constant changement fait en sorte que les conditions expérimentales sont inévitablement sujettes à des facteurs hors de contrôle de l'expérimentateur qui ne sont pas pris en compte par le modèle proposé.

L'examen des profils de biomasse sèche de la figure 5.11 montre que les paramètres déterminés proposent un compromis qui fait que pour certaines cultures, la biomasse est surestimée (C7,C8,C9) et pour d'autres, elle est sous-estimée (C1,C2). L'arrêt de la croissance pour toutes ces cultures est provoqué par un épuisement des sources de carbone ou d'azote (Annexe G).

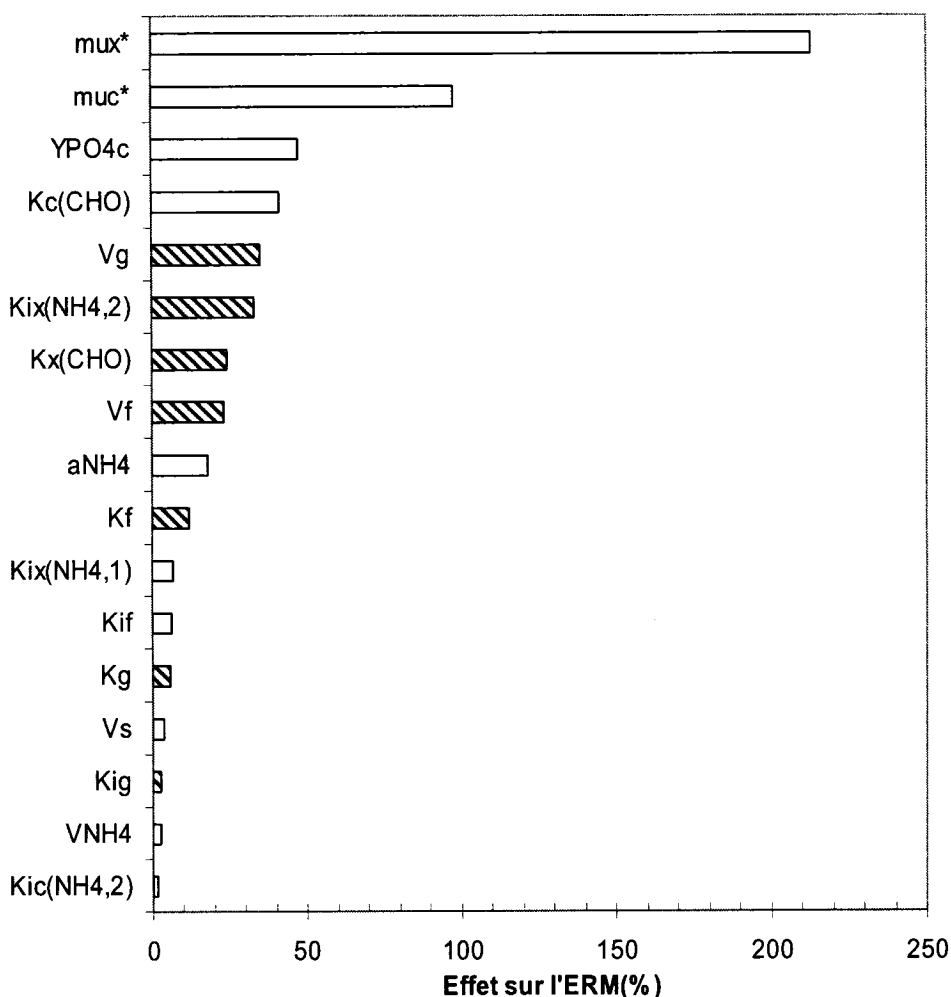
La culture pour laquelle l'erreur est la plus importante est la culture C9. La phase plateau pour la biomasse et la concentration cellulaire est surestimée, les taux de croissance semblent trop élevés. Cette culture (figure G-9) est particulière puisque la principale source de carbone fournie est le fructose. La culture C10 a des conditions semblables mais la source de carbone est du glucose. L'estimation de C10 est plus

précise. Les expériences de cinétique de croissance furent effectuées avec le glucose. Ceci suggère que les taux de croissance varient en fonction de la source de carbone utilisée. En pratique, il est rare que le fructose ne soit utilisé comme seule source de carbone.

Les profils des taux de croissance simulés (Annexe G) montrent que ceux-ci sont plus faibles à l'inoculation et augmentent graduellement pour toutes les cultures. La partie ascendante initiale est causée par la concentration d'ammonium à l'inoculation. On remarque que cette partie est plus prononcée pour les cultures C7, C8 et encore plus pour C9 et C10. Ceci s'explique par le fait que ces cultures ont une concentration initiale plus élevée en ammonium à l'inoculation (C7 = 8mM, C8 = 8mM, C9 = 20mM, C10 = 20mM). L'effet d'inhibition de l'ammonium ralenti la croissance à l'inoculation. Pour les cultures C1 à C6 (qui contiennent du sucrose), l'ammonium est d'environ 1 mM et l'effet d'inhibition est négligeable. Le facteur qui ralenti la croissance est le temps nécessaire à l'hydrolyse du sucrose. L'effet des constantes  $K_{CHO}$  dans les cinétiques de croissance est observé. En début de culture, la concentration en glucose et en fructose est nulle, à mesure que ceux-ci sont libérés par l'hydrolyse, les taux de croissance augmentent graduellement. Tel que mentionné à la section 2.4.1, la phase de latence est due en partie à l'adaptation au nouveau milieu de culture. Dans le modèle, cette adaptation est représentée par une concentration élevée en ammonium (à mesure que l'ammonium initial est absorbé, le taux de croissance augmente graduellement) et par l'hydrolyse du sucrose (qui ne dure que quelques heures après l'inoculation). La croissance à l'inoculation sera d'autant plus faible si la concentration cellulaire initiale est faible (absorption d'ammonium et hydrolyse plus lents), ce qui est également observé en pratique.

## 5.8 Étude de sensibilité des paramètres

Afin d'apprécier la sensibilité de l'estimation du modèle, on fait varier individuellement la valeur des paramètres. Pour chacun, l'erreur d'estimation est évaluée pour  $\pm 50\%$ . La variation de l'erreur d'estimation obtenue pour un paramètre est présentée aux figures 5.13 (Biomasse sèche) et 5.14 (Dénombrement cellulaire).



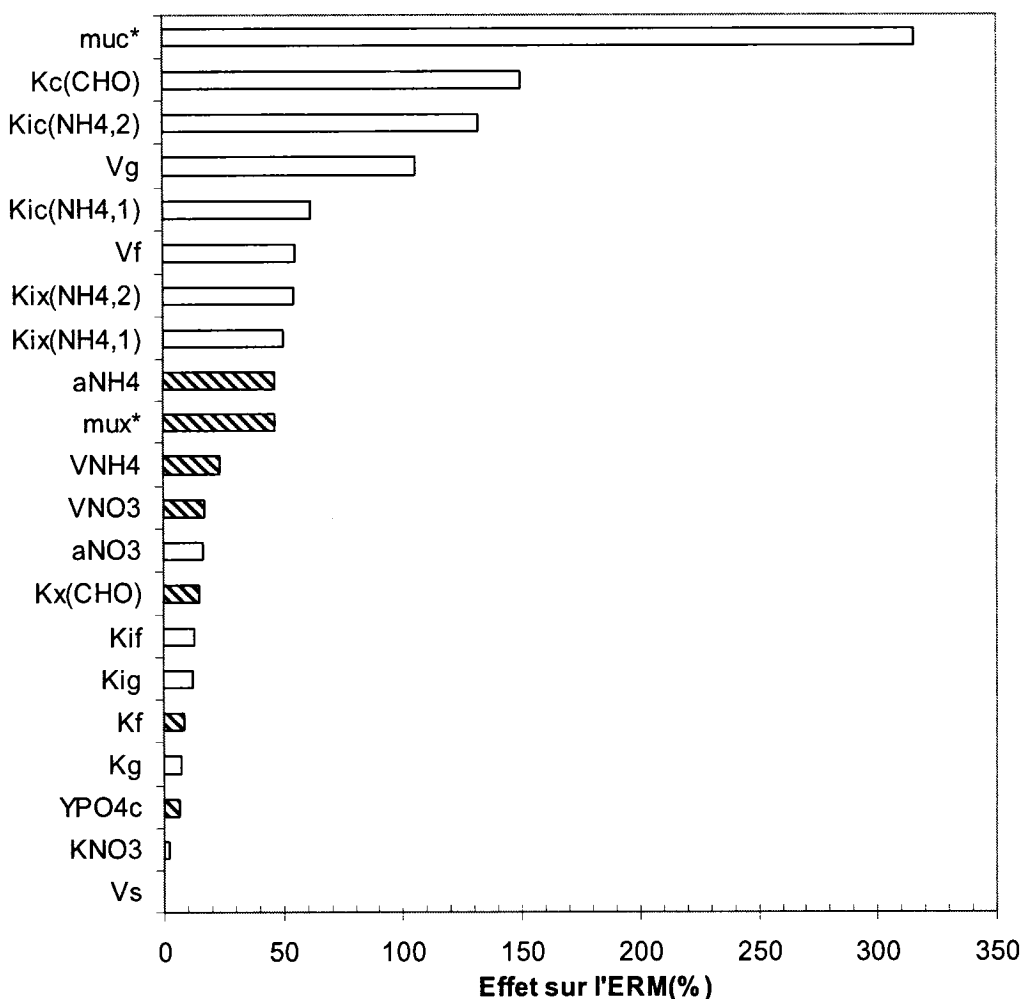
**Figure 5-13 :** Variation de l'erreur relative moyenne d'estimation du modèle sur la biomasse sèche.  
Blanc : +50%, Hachures : -50%

Le paramètre ayant le plus grand impact sur la biomasse sèche est  $\mu_{x_{max}}$ . Ce résultat était prévisible puisque le l'accroissement de la biomasse sèche est directement

proportionnel à ce paramètre. L'erreur maximale provient d'une variation de +50%. Cette déviation provient de deux sources. D'abord, la raison la plus évidente est que la biomasse sèche croît deux fois plus rapidement. D'autre part, les sources d'azote et de carbone sont absorbées deux fois plus rapidement, un épuisement prématuré d'un de ces nutriment provoque l'arrêt soudain de la croissance sous estimant ainsi la phase plateau de la courbe de croissance.

L'autre paramètre ayant un impact important est le taux de croissance maximal du dénombrement cellulaire. La variation de l'erreur de 100% provient d'une augmentation de 50% du paramètre. Ceci s'explique par le fait que la consommation du phosphate intracellulaire est régit par l'accroissement du dénombrement cellulaire. Si les cellules se divisent deux fois plus rapidement, le  $\text{PO}_4$  est plus rapidement épuisé, ce qui interrompt la croissance de la biomasse sèche prématurément. Le même phénomène est observé si le rendement du  $\text{PO}_4$  est doublé ( $Y_{\text{PO}_4/\text{C}}$ ), l'erreur d'estimation augmente alors de 50%.





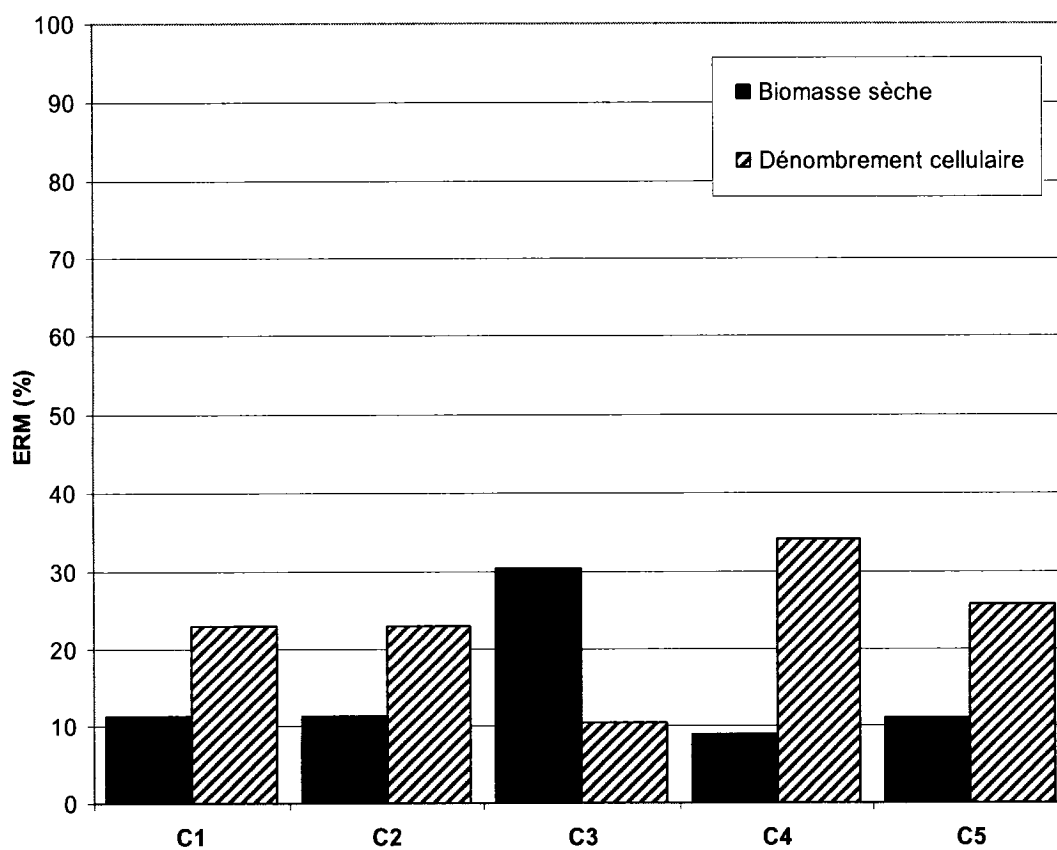
**Figure 5-14 :** Variation de l'erreur relative moyenne d'estimation du modèle sur le dénombrement cellulaire . Blanc :+50%, Hachures :-50%

Comme pour la biomasse sèche, le dénombrement cellulaire dépend principalement de son taux de croissance maximal. Le deuxième paramètre pour lequel le dénombrement cellulaire est le plus sensible est la constante de cinétique de croissance des sources de carbone ( $K_C$  CHO). Celle-ci est de 6 g/L, lorsque la concentration des sucres dans le milieu de culture atteint cette valeur, la vitesse de croissance est à 50% du maximum. Ainsi, en doublant sa valeur, le taux de prolifération est ralenti, la moitié de la vitesse maximale n'est atteinte qu'à 12 g/L. Suivent ensuite les paramètres de l'inhibition de la

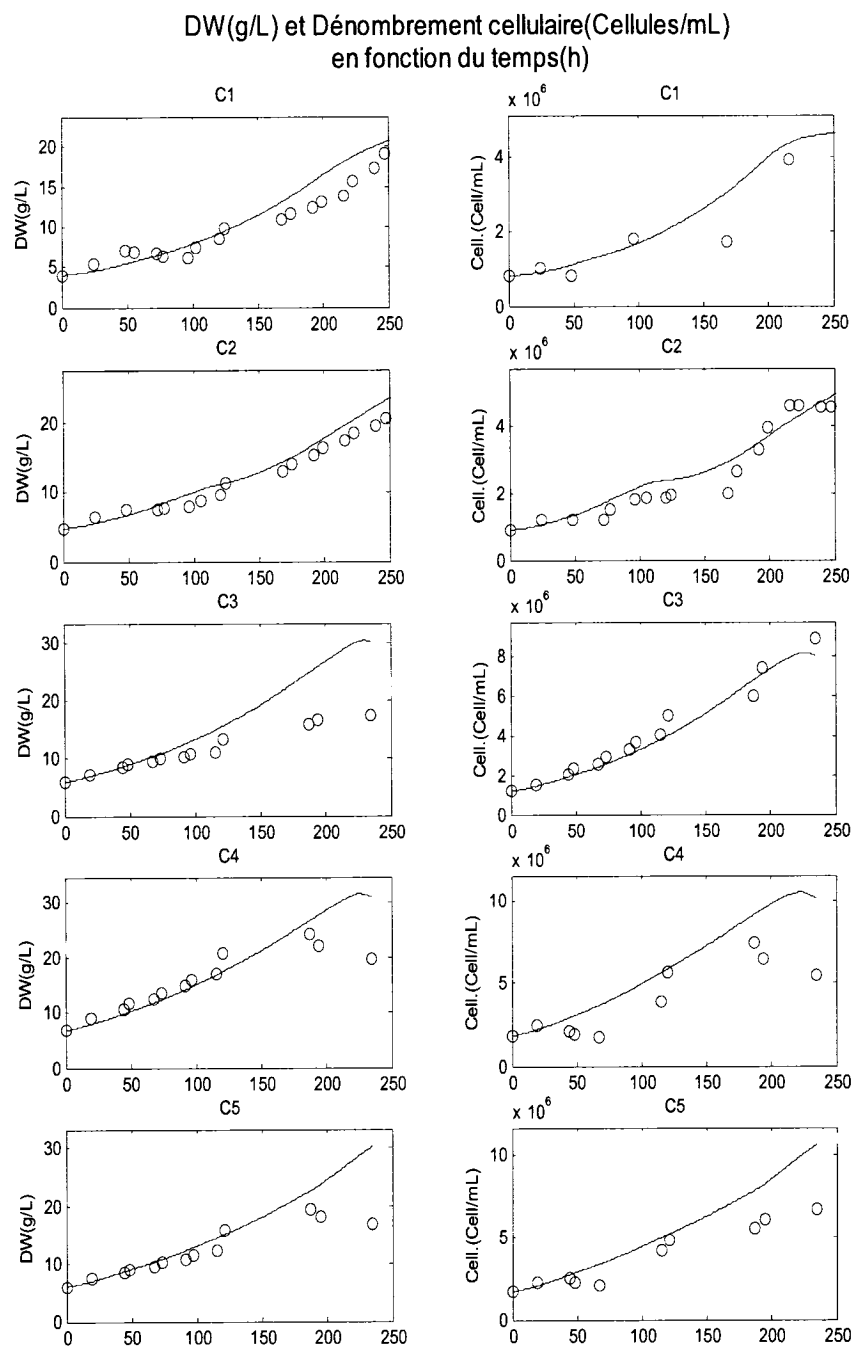
croissance par l'ammonium et la vitesse d'absorption maximale du glucose et du fructose.

## **5.9 Validation du modèle**

La validation du modèle est effectuée en simulant des cultures n'ayant pas servies à la détermination des paramètres. On introduit également la simulation de cultures en cuvette alimentée. Cinq cultures en bioréacteur sont utilisées. Les cultures C1 et C2 sont alimentées en continue avec de l'ammonium et du nitrate à l'aide de pompes péristaltiques. Pour les trois autres, de l'ammonium et du phosphate sont fournis. Puisque le modèle fut développé avec des cultures en cuvette seulement, la validation du modèle avec des conditions expérimentales différentes permet d'évaluer sa capacité à simuler des cultures différentes. Les figures suivantes montrent l'erreur relative moyenne pour la biomasse sèche et le dénombrement cellulaire (figure 5.15) ainsi que leur profils (figure 5.16). Le détail des simulations est présenté à l'annexe H.



**Figure 5-15 :** Erreur relative moyenne d'estimation du modèle sur le dénombrement cellulaire et la biomasse sèche des cultures en bioréacteur utilisées pour la validation du modèle.



**Figure 5-16 :** Profils de la biomasse sèche (à gauche) et de dénombrement cellulaire (à droite) des cultures de validation.

L'erreur relative moyenne est de 15% pour la biomasse sèche et de 23% pour le dénombrement cellulaire (figure 5.15). La culture C3 est celle pour laquelle l'erreur relative sur la biomasse sèche est la plus importante. Le modèle surestime la biomasse sèche à partir d'environ 175 heures (Figure 5.16). Ceci s'explique en partie par le fait que les cultures avaient atteint une telle concentration cellulaire en fin de culture que le mélange et l'échantillonnage devenaient difficiles. Cette contrainte du système est observée pour des concentrations en biomasse sèche d'environ 15 gDW/L et plus. Lorsque la concentration approche 20 gDW/L, les cultures doivent être arrêtées puisque le mélange n'est plus efficace et le demande en oxygène est telle que la limite des débitmètres est atteinte, rendant le contrôle de l'oxygène dissous impossible. De plus, sous l'action du ruban hélicoïdal, les cellules ont tendance à s'accumuler hors du milieu de culture en tête de bioréacteur, ce qui peut fausser la mesure de la biomasse sèche et du dénombrement cellulaire.

Le modèle réussit à prédire la croissance de ces cultures avec une erreur comparable à celle obtenue lors de la détermination des paramètres (section 5.7). Ces résultats suggèrent que le modèle a la capacité de prédire des cultures ayant des conditions d'opération différentes de celle utilisées lors de son développement.

Dans la culture C1 (annexe H, figure H.1), de l'ammonium et du nitrate sont ajoutés en continu. La biomasse sèche, la concentration cellulaire, le nitrate, l'ammonium et les sources de carbone sont bien simulés jusqu'à 200h. À ce moment, l'alimentation en ammonium passe soudainement de 7 mM/j à 17 mM/j. À partir de ce moment, la concentration d'ammonium simulée augmente rapidement, ce qui stoppe la croissance par inhibition. Par contre, les données expérimentales montrent que la concentration en ammonium demeure sensiblement constante après l'augmentation du débit. Le taux réel d'absorption est beaucoup plus élevé que ne le suggère la cinétique modélisée. Un

ajout constant d'ammonium à peut-être pour effet de modifier la cinétique d'absorption en stimulant la production de transporteurs (Williams et Miller, 2001).

Pour C2, les profils simulés sont assez fidèles aux données expérimentales. À 100 heures, une pulse d'ammonium de 17 mM/j est alimenté dans le bioréacteur pendant 20 heures. Les concentrations d'ammonium mesurées et simulées augmentent rapidement jusqu'à 120h. L'augmentation soudaine de l'ammonium entraîne un arrêt de la croissance. La concentration cellulaire et de biomasse sèche mesurée cesse de croître de 100 à 160 heures. Le modèle réagit également à l'augmentation de concentration comme le démontre le profils des taux de croissance. Cependant, il sous-estime l'effet de l'inhibition sur le dénombrement cellulaire.

Les cultures C3, C4 et C5 ont des conditions expérimentales semblables. Elles sont alimentées avec des pompes péristaltiques en ammonium et en phosphate, elles ont une biomasse sèche initiale d'environ 5 g/L et des concentrations en nutriment comparables. Étrangement, le biomasse sèche est grandement surestimée pour la culture C3 alors qu'elle est correcte pour C4 et C5. Ceci a pour effet d'augmenter la consommation des nutriments, le profil de nitrate et de glucose est sous estimé. Le modèle estime convenablement le dénombrement cellulaire. Dans le cas de C4 et C5, la modélisation est meilleure et les profils de concentration de nitrate correspondent aux données expérimentales. Le modèle décroche pour l'ammonium à mesure que le taux d'ajout augmente et C3 serait semblable si la biomasse était plus proches des données expérimentales. Le décrochage observé suggère encore un taux de consommation de l'ammonium plus élevé que la cinétique modélisée.

## 5.10 Limites du modèle

Lors du développement du modèle, certaines hypothèses furent émises et les conditions expérimentales observées et intégrées au modèle couvre une gamme de conditions dans lesquelles le modèle est considéré valide. Certaines limites doivent être fixées à l'intérieur desquelles le modèle est applicable.

D'abord, la prédiction des variables de croissance est restreinte aux variables intégrées au modèle (Sources de carbone,  $\text{PO}_4$ ,  $\text{NO}_3$ ,  $\text{NH}_4$ ). D'autres conditions environnementales omises du modèle doivent être contrôlées afin d'éviter toute limitation. Des précautions expérimentales doivent être prises. L'oxygène dissous est la plus critique. Les résultats de la section 4.1 montrent qu'une concentration de 1.5% d'oxygène dissous limite la croissance. Pour des expériences en flacons, le bouchon doit être adéquat afin de permettre un transfert d'oxygène suffisant (Gupta et Rao, 2003). Les autres nutriments doivent également être maintenus à des niveaux non limitants (incluant les vitamines et les hormones). Les limites physiques du système sont également des paramètres pouvant influencer la croissance et l'atteinte de ces limites aura un impact sur la validité du modèle. L'état physiologique des cellules est un paramètre important et l'établissement d'une routine rigoureuse de sous cultures et un suivi de celles-ci permet de réduire la variabilité des inocula.

La phase de mortalité de la courbe de croissance n'est pas modélisée et donc, les prédictions du modèle se limitent à la phase de croissance exponentielle et de croissance stationnaire. La phase stationnaire est prédite par l'épuisement d'un nutriment. Or, dans le cas du phosphate intracellulaire, la concentration initiale n'est pas connue ce qui réduit la capacité du modèle à prévoir une limitation par le phosphate. De plus, les réserves d'azote intracellulaires ne sont pas considérées, ce qui limite la précision de la prédiction d'un arrêt de croissance par épuisement d'azote. Selon les cultures effectuées, la phase stationnaire n'est généralement pas très longue et

on observe souvent un passage directe à la phase de mortalité apparente. Ceci est particulièrement vrai pour le dénombrement cellulaire.

La cinétique d'absorption de l'ammonium est adéquate pour des cultures en cuvée et au début des cultures alimentées. Cependant, après une alimentation en continue, un changement des vitesses d'absorption est observé dans certaines cultures. À des taux élevés d'ajout d'ammonium, les données expérimentales montrent que le taux d'absorption réel est plus élevé que ce que le modèle prédit. Ceci fait en sorte que les variables de croissance (DW et concentration cellulaire) décrochent puisque l'accumulation d'ammonium prédit par le modèle inhibe éventuellement la croissance.



## 6 Conclusions et recommandations

L'objectif de ce projet était de développer un modèle de croissance massique prédictif pour une suspension de *C. roseus* afin de mieux comprendre, décrire et prédire sa phase de croissance. La première étape afin d'atteindre cet objectif était la caractérisation de la croissance en observant l'effet de la concentration des macronutriments et en déterminant les rendements de ceux-ci. Avec cette information, le modèle est adapté et sa structure est modifiée au besoin.

Bien que l'oxygène dissous ne soit pas un paramètre considéré par le modèle, des cultures à différentes concentrations ont montré que celle-ci doit être maintenue à au moins 30% afin d'éliminer toute limitation de la croissance. Les rendements des sources de carbone déterminés sont identiques pour le glucose, le fructose et le sucrose. D'autre part, l'étude des cinétiques de croissance montre que la vitesse de croissance de la biomasse sèche et du dénombrement cellulaire suit une cinétique de Michaelis-Menten en fonction de la concentration en source de carbone. De plus, une relation évidente entre la concentration de glucose et le rapport biomasse humide/biomasse sèche est observée. Plus la concentration de glucose est élevée, moins le contenu en eau de celle-ci (donc son volume) est élevé. Cette particularité est digne d'intérêt dans l'optique du développement d'un procédé industriel. En effet, il est possible d'augmenter le nombre de cellules dans un volume donné en augmentant la concentration en glucose dans le milieu de culture. On obtient ainsi un meilleur rendement volumique pour les métabolites secondaires produits. L'étude des ions azotés a permis de déterminer que l'ammonium et le nitrate ont des rendements identiques pour la biomasse sèche et le dénombrement cellulaire. L'étude des cinétiques de croissance permet d'identifier qu'une inhibition des taux de croissance survient lorsque la concentration extracellulaire en ammonium est élevée. Dans le cas

du phosphate, les cinétiques de croissance n'ont pas permis d'identifier un effet d'inhibition, même lorsque celui-ci est alimenté en continue.

La modélisation de l'absorption des nutriments est la partie du modèle qui diffère le plus du modèle original. Une attention particulière a été portée sur cet aspect du modèle et les équations d'absorption s'inspire, autant que possible des cinétiques des systèmes de transporteurs des cellules végétales qui sont disponibles dans la littérature.

Dans le cas des sources de carbone, le sucrose est entièrement hydrolysé dans le milieu extracellulaire sous l'action des invertases acides des membranes cellulaires. Une molécule de glucose et une de fructose est libéré. Le glucose et le fructose extracellulaire sont absorbés par les cellules suivant une cinétique de Michaelis-Menten avec inhibiteur. Le glucose et le fructose sont en compétition pour le même transporteur et ce dernier a plus d'affinité pour le glucose. Cette représentation permet d'expliquer le fait que le glucose est absorbé plus rapidement que le fructose.

L'absorption des ions azotés est modélisée par deux termes. Le premier représente le transport à basse affinité. Ce type de transport est non saturant et est directement proportionnel à la concentration dans le milieu extracellulaire. Le deuxième terme est le transport à haute affinité. Ce transport est représenté par une fonction échelon avec une valeur de  $K_m$  pour les deux ions de 0.1 mM. L'inclusion de ce type de transport permet d'éviter un ralentissement soudain de la vitesse d'absorption lorsque la concentration de l'ion tend vers zéro comme le suggère l'observation des données expérimentale. Les expériences de validation indiquent que la vitesse de l'absorption de l'ammonium est différente à celle proposée si cet ion est fourni à la culture pendant une période prolongée. En effet, la consommation apparente lors des cultures était plus rapide que le modèle, ce qui faussait l'estimation des concentrations et affectait la performance du modèle.

Le transport du phosphate est particulier puisque les concentrations mesurées sont de l'ordre du mM. L'épuisement de cet ion est rapide et sa cinétique d'absorption ne peut être déterminée avec précision. Une équation de Michaelis-Menten est proposée et les paramètres sont déterminés avec la culture ayant le moins de biomasse sèche à l'inoculation. Plus de précision sur l'absorption pourrait être obtenu en faisant des cultures à base concentration cellulaire et en échantillonnant la culture à toutes les heures. La précision de l'absorption est cependant suffisante pour les cultures utilisées lors de ce projet.

Les taux de croissance dépendent de la concentration extracellulaire des ions azotés, du phosphate intracellulaire et des sources de carbone extracellulaire. Un épuisement en azote extracellulaire ou en phosphate intracellulaire provoque l'arrêt soudain de la croissance. Dans le cas des sources de carbone, les taux de croissance suivent une cinétique de Michaelis-Menten tel que déterminé à la section 5.2.3. De plus, les taux de croissance sont ralentis à mesure que la concentration d'ammonium augmente, modélisant l'effet d'inhibition sur la croissance observé lors des expérimentations.

Bien que le modèle prédit la concentration de biomasse sèche, le dénombrement cellulaire et la concentration des principaux macronutriments, certaines avenues demeurent inexplorées. D'abord, il serait intéressant d'explorer l'effet des autres ions sur la croissance. Le chlore, le potassium, le sulfate, le sodium et le magnésium sont mesurés lors des cultures et bien qu'ils soient souvent considérés comme ayant un impact moins direct sur la croissance des cellules végétales, l'effet d'un épuisement ou d'un excès de ceux-ci permettrait d'approfondir la compréhension de la croissance de suspension de cellules végétales. Le pH, le CO<sub>2</sub> et l'oxygène dissous sont également des variables qui pourraient être investiguées et éventuellement incluses dans le modèle.

L'inclusion d'un taux de mortalité permettrait une description plus complète de la phase de croissance. Le présent modèle est limité à la croissance exponentielle et à la phase plateau. Le phase de latence modélisée dépend entièrement de la concentration initiale en ammonium. Il serait également possible de prendre en compte les contraintes du système utilisé. Tout système de culture de suspension cellulaire possède une capacité maximale de densité cellulaire. Au-delà de ce seuil, les contraintes du système (débit d'oxygène maximal, mélange, méthode d'échantillonnage) deviennent des variables affectant la croissance. Dans l'optique du développement d'un procédé industriel, il est primordial d'identifier et de quantifier ces limites.

Un système de culture de cellules végétales intéressant est la perfusion en bioréacteur. Deux pompes péristaltiques sont connectées au bioréacteur. Une alimente la culture avec du milieu de culture frais et l'autre retire le milieu usé sans retirer les cellules de la suspension. En ajustant la concentration de l'alimentation et les débits d'alimentation et de sortie, il est possible de maintenir la concentration des nutriments constante plus facilement qu'avec une culture en cuvée alimentée. Cette technique possède des avantages importants pour la croissance de cellules végétales. D'abord, en maintenant la concentration des nutriments constante, on évite la perturbation métabolique de la suspension cellulaire, celle-ci devient plus prévisible puisque son état nutritionnel demeure constant, les cellules n'ont pas à constamment s'adapter à la variation de leur environnement. D'autre part, le fait de retirer le milieu usé pourrait permettre de retirer des composés toxiques qui s'accumuleraient dans le milieu de culture. Le présent modèle pourrait être adapté à un tel système assez aisément en ajoutant un terme de sortie aux bilans de matière. Des expériences de perfusion avec d'autres espèces chez phytobiotech (résultats non montrés) ont permis de vérifier que les taux de croissance étaient améliorés comparativement aux modes cuvée et cuvée alimentée.

## 7 Bibliographie

BAILEY C.M., NICHOLSON, H. 1989. "A New Structured Model for Plant Cell Culture". *Biotechnology and Bioengineering*. 34:1331-1336.

BAILEY, J. E., OLIS, D. F. 1986. *Biochemical Engineering Fundamentals*. New York. McGraw Hill.

BARFORD J.P., HALL, R. J. 1978. "An Evaluation of the Approaches to the Mathematical Modelling of Microbial Growth". *Process Bioengineering*. 18: 22-29.

BASSIRIRAD H. 2000. "Kinetics of Nutrient Uptake by Roots: Responses to Global Change". *New Phytol.* 147:155-169 .

BECKING J.H. 1956. "On the Mechanism of Ammonium Uptake by Maize Roots". *Acta Botanica Neerlandica*. 5: 2-79.

BIELESKI R.L. 1973. "Phosphate Pools, Phosphate Transport, and Phosphate Availability". *Ann. Rev. Plant Physiol.* 24: 225-252.

BLACK C.C., LOBODA, T., JIN-QIANG, C., SUN, S. J. 1995. "Can Sucrose Cleavage Enzymes Serve As Markers for Sink Strength and Is Sucrose a Signal Molecule During Plant Sink Development?". *American Society of Plant Physiologists*. 15: 49-64.

- BLOOM A.J., JACKSON, L. E., SMART, D. R. 1993. "Root Growth As a Function of Ammonium and Nitrate in the Root Zone". *Plant Cell and Environnement*. 16:199-206.
- BLOOM AJ C.F. 1981. "Differences in Steady-State Net Ammonium and Nitrate Influx by Cold and Warm Adapted Barley Varieties". *Plant Physiol.* 68: 1064-1067.
- BOLANOS L., LUKASZEWSKI, K., BONILLA , I., BLEVINS, D. 2004. "Why Boron?". *Plant Physiology and Biochemistry*. 42: 907–912.
- BOTHA F., O'KENNEDY, M. 1998. "Carbohydrate Utilisation by Cell Suspension Cultures of *Phaseolus Vulgaris* ". *Physiologia Plantarum*. 102:429-436.
- BOUCHARD-MARCHAND, E. 2000. *Études biocinétiques et nutritionnelles de racines transformées de carotte en culture in vitro*. Mémoire de maîtrise, Montréal : École Polytechnique de Montréal.
- BOUMA, D. 1975. *The uptake and translocation of sulphur in plant*. Sydney, Ed. K.D. McLachlan. 79.
- BUTTNER M., SAUER, N. 2000. "Monosaccharide Transporters in Plants: Structure, Function and Physiology". *Biochim Biophys Acta*. 1465:1. 263-274.
- CABRAL P., COSTA, L., CABRAL, S. 2000. "A Structured Growth Model for *Cynara Cardunculus* Cell Suspension". *Bioprocess Enginneering*. 23: 199-203.
- CAMPBELL, N. A. 1995. *Biologie*. St-Laurent, Ed. ERPI. 1190.

- CASH, J.R., KARP, A.H. 1990. "A Variable Order Runge-Kutta Method for Initial Value Problems with Rapidly Varying Right-Hand Sides". *ACM Transactions on Mathematical Software*, 16:3. 200-222.
- CASPARI T., WILL, A., OPEKAROVA, M., SAUER, N., TANNER, W. 1994. "Hexose/H<sup>+</sup> Symporters in Lower and Higher Plants". *J Exp Biol.* 196:483-491.
- CHRISPEELS H., CRAWFORD, N., SCHROEDER, J. 1999. "Proteins for Transport of Water and Mineral Nutrients Across the Membranes of Plant Cells". *The Plant Cell.* 11:661-675.
- CLARKSON D., HANSON.J. 1980. "The Mineral Nutrition of Higher Plants". *Annual Review of Physiology.* 31: 239-298
- CORUZZI G., BUSH, D. R. 2001. "Nitrogen and Carbon Nutrient and Metabolite Signaling in Plants". *Plant Physiol.* 125:1. 61-64.
- CRAWFORD N.,GLASS, A. 1998. "Molecular and Physiological Aspects of Nitrate Uptake in Plants". *Trends in Plant Science.* 3:10. 389-395 .
- CRAWFORD N.M. 1995. "Nitrate: Nutrient and Signal for Plant Growth". *The Plant Cell.* 7: 859-868.

- CURIE C., BRIAT, J. F. 2003. "Iron transport and signalling in plants". *Annu. Rev. Plant Biol.* 54: 183-206.
- CURTIS W.R., HASEGAWA, P. M., EMERY, A. H. 1991. "Modeling Linear and Variable Growth in Phosphate Limited Suspension Cultures of Opium Poppy". *Biotechnology and Bioengineering.* 38:4. 371-379.
- ESKEW D.L., WELCH, R. M., NORVELL, W. A. 1984. "Nickel in Higher Plants". *Plant Physiology.* 76:3. 691-693.
- FOX T.C., GUERINOT, M. L. 1998. "Molecular Biology of Cation Transport in Plants". *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49: 669–696.
- GALIPEAU, S. 2004. *Étude de la phase de production d'alcaloïdes indoliques par une suspension cellulaire de Catharanthus roseus*. Mémoire de maîtrise, Montréal : École Polytechnique de Montréal.
- GAMBORG O.L 1982. *Callus and cell culture*. Sakatoon: Ed. Wetter et Constabel. 435.
- GAMBORG O.L., MILLER, R. A., OJIMA, K. 1968. "Nutrient Requirements of Suspension Cultures of Soybean Root Cells". *Exp Cell Res.* 50:1, 151-8.
- GARNETT T.P., SHABALA, S. N., SMETHURST, P. J., NEWMAN, I. A. 2003. "Kinetics of Ammonium and Nitrate Uptake by Eucalypt Roots and Associated Proton Fluxes Measured Using Ion Selective Microelectrodes". *Functional Plant Biology.* 30: 1165–1176.



- GLASS A.D., BRITTO, D. T., KAISER, B. N., KRONZUCKER, H. J., KUMAR, A., OKAMOTO, M., RAWAT, S., SIDDIQI, M. Y., UNKLES, S. E., VIDMAR, J. J. 2001. "Nitrogen Transport in Plants, With an Emphasis on the Regulation of Fluxes to Match Plant Demand". *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 164: 199-207.
- GREINER S., WEIL, M., KRAUSGRILL, S., RAUSCH, T. 1995. "A Tobacco CDNA Coding for Cell-Wall Invertase". *Plant Physiol.* 108 :2. 825-826.
- GRM B.,MELE, M. 1980. "Model of Growth and Ergot Alkaloid Production of *Claviceps Purpurea*". *Biotechnology and Bioengineering.* 22:255-270.
- GROSSMAN A. 2001. "Macronutrient utilization by photosynthetic eukaryotes and the fabric of interactions". *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52:163-210.
- GUPTA A.,RAO, V. 2003. "A Study of Oxygen Transfer in Shake Flasks Using a Non-Invasive Oxygen Sensor". *Biotech. and Bioeng.* 84:3. 351-358.
- GUPTA K. 1985. "A Review of Recent Developments in Solving ODES". *Computing Surveys.* 17:1. 5-47.
- HAEHNEL W. 1984. "Photosynthetic Electron Transport in Higher Plants". *Annual Review of Plant Physiology.* 35: 659-693.
- HAHLBROCK K. 1975. "Further Studies on the Relationship Between the Rates of Nitrate Uptake, Growth and Conductivity Changes in the Medium of Plant Cell Suspension Cultures". *Planta.* 124: 311-318.

- HEPLER P.K.,WAYNE, R. O. 1985. "Calcium and Plant Development". *Annual Review of Plant Physiology*. 36: 397-439.
- HOLME I. 1998. "Growth Characteristics and Nutrient Depletion of *Miscanthus Ogiformis* Honda 'Giganteus' Suspension Cultures". *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 53: 143-151.
- JOLICOEUR M., CHAVARIE C., CARREAU, P. J., ARCHAMBAULT, J. 1992. "Development of a Helical-Ribbon Impeller Bioreactor for High-Density Plant Cell Suspension Culture". *Biotechnology and Bioengineering*. 39:511-521.
- KING P.J. 1977. "Studies on the Growth in Culture of Plant Cells XXII: Growth Limitation by Nitrate and Glucose in Chemostat Cultures of *Acer Pseudoplatanus L.*". *Journal of Experimental Botany*. 28:108. 142-155.
- KLANN E.M., HALL, B., BENNETT, A. B. 1996. "Antisense Acid Invertase (TIV1) Gene Alters Soluble Sugar Composition and Size in Transgenic Tomato Fruit". *Plant Physiol.* 112:3. 1321-30.
- KLEINSMITH, K. J.,KISH, V. M. 1988. *Principles of cell biology*. New York: Ed Harper and Row. 796.
- KREYSIG, E. 1993. *Advanced Engineering Mathematics*. New York. Ed. Wiley. 1271.
- KRIKORIAN, A. D.,BERQUAM, D. L. 2003. *Plant tissue culture: 100 years since Gottlieb Haberlandt*. New York. Ed. Springer-Verlag. 150.

- KRONZUCKER H., GLASS, A., SIDDIQI, Y. 1999. "Inhibition of Nitrate Uptake by Ammonium in Barley. Analysis of Component Fluxes". *Plant Physiology*. 120:283-291.
- KROOK J., LINUS, V. 2000. "Uptake and Phosphorylation of Glucose and Fructose in *Daucus Carota* Cell Suspensions Are Differently Regulated". *Plant Physiol. Biochem.* 38:602-612.
- LAGARIAS J., REEDS, J., WRIGHT, M. 1998. "Convergence Properties of the Nelder-Mead Simplex Method in Low Dimensions". *SIAM J. Optim.* 9:1. 112-147.
- LUDWIG A., STOLZ, J., SAUER, N. 2000. "Plant Sucrose-H<sup>+</sup> Symporters Mediate the Transport of Vitamin H". *Plant J.* 24:4: 503-9.
- LYCKLAMA J.C. 1963. "The Absorption of Ammonium and Nitrate by Perennial Ryegrass.". *Acta Bot. Neerl.* 12: 461-423.
- MERCIER R.W., GOGARTEN, J. P. 1995. "A Second Cell Wall Acid Invertase Gene in *Arabidopsis Thaliana*". *Plant Physiol.* 107:2: 659-60.
- MICHAL, G. 1999. *Biochemical Pathways*. New York. John Wiley & Sons inc. 674.
- MISAWA, M. 1994. *Plant cell and tissue culture: alternatives for metabolite production*. Rome. AGS bulletin. 95.

- MOHD A., ARIFF, A., MARZIAH, M., ALI, A. 2000. "Growth and Anthraquinone Production of *Morinda Elliptica* Cell Suspension Cultures in a Stirred-Tank Bioreactor". *J. Agric. Food Chem.* 48:4432-4438.
- MURASHIGE T., SKOOG, F. 1962. "A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassay With Tobacco Tissue Cultures". *Physiol. Plant.* 15: 473-479 .
- NADER, S. S. 1987. *Biologie:Évolution, Diversité et environnement*. Ottawa. Ed. Reynald Goulet inc. 767
- NOÉ A.C. 1934. "Gottlieb Haberlandt". *Plant Physiol.* 9:4. 850-855.
- OLCZAK M., MORAWIECKA, B., WTOREK, T. 2003. "Plant Purple Acid Phosphatases : Genes, Structures and Biological Function". *Acta Biochemica Polonica.* 50:4. 1245-1253.
- OLIVEIRA J., TAVARES, R., GERÓS, H. 2002. "Utilization and Transport of Glucose in *Olea Europaea* Cell Suspensions". *Plant Cell Physiol.* 43:12. 1510-1517.
- PANDEY K.K., COUCHMAN, P., DE LAUTOUR, G., WILLIAMS, E. 1974. "A Tissue Culture Technique for Rapid Clonal Multiplication of Androgenic Haploids of Tobacco". *New Zealand Journal of Botany.* 13: 317-20.
- PAZOUTOVA S., VOTRUBA, J., REHACEK, Z. 1981. "A Mathematical Model of Growth and Alkaloid Production in the Submerged Culture of *Claviceps Purpurea*". *Biotechnology and Bioengineering.* 28: 2837-2849.

- PENNAZIO S. 2002. "The Culture of Single Plant Cells: a Historical View". *Riv Biol.* 95:3. 455-71.
- PÉPIN M.-F., ARCHAMBAULT, J., CHAVARIE, C., CORMIER, F. 1995. "Growth Kinetics of *Vitis Vinifera* Cell Suspension Cultures. I. Shake Flask Cultures". *Biotechnology and Bioengineering.* 47:131-138.
- POIRIER Y.,BUCHER, M. 2002. "Phosphate Transport and Homeostasis in Arabidopsis". *The Arabidopsis Book:American Society of Plant Biologists.* 1-35.
- POIRIER, Y.,BUCHER, M. 2002. *Phosphate Transport and Homeostasis in Arabidopsis.* Rockville. American Society of Plant Biologists.
- PRAKASH G.,SRIVASTAVA, A. K. 2005. "Modeling of Azadirachtin Production by Azadirachta Indica and Its Use for Feed Forward Optimization Studies". *Biochemical Engineering Journal.* In press, corected proof: 1-7.
- PRESCOTT. H., HARLEY, P.,KLEIN, R. 1995. *Microbiologie.* Bruxelles. DeBoeck université. 1014.
- RAGHOTHAMA K.G. 1999. "PHOSPHATE ACQUISITION". *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50: 665-693.
- RAUSCH C.,BUCHER, M. 2002. "Molecular Mechanisms of Phosphate Transport in Plants". *Planta.* 216: 23-37.

- ROY A.T., KOUTOULIS, A., DEEPESH N. 2000. "Cell Suspension Culture and Plant Regeneration in the Latex-Producing Plant, *Calotropis Gigantea* (Linn.) R. Br.". *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. **63:15**. 15–22.
- SANDERS D., BROWNLEE, C., HARPER, J. F. 1999. "Communicating With Calcium". *The Plant Cell*. 11: 691-706.
- SARRAILH, S. 2004. *Étude de l'élicitation d'une suspension cellulaire de Catharanthus roseus*. Mémoire de maîtrise, École Polytechnique de Montréal.
- SCHACHTMAN D.P., REID, R. J., AYLING, S. M. 1998. "Phosphorus Uptake by Plants: From Soil to Cell". *Plant Physiol*. 116: 447-453.
- SCHMIDT W. 2003. "Iron Solutions: Acquisition Strategies and Signaling Pathways in Plants". *Trends in Plant Science*. 8:4. 188-193.
- SCOTT L., LOGAN, D. C. 2004. "The Birth of Cell Biology". *New Phytologist*. 163: 1–4.
- SHIMANO F., ASHIHARA, H. 2006. "Effect of Long-Term Phosphate Starvation on the Levels and Metabolism of Purine Nucleotides in Suspension-Cultured *Catharanthus Roseus* Cells". *Phytochemistry*. 67: 132-141.
- SHIN K., CHAKRABARTY, D., KO, J., HAN, S., YOEUP, K. 2003. "Sucrose Utilization and Mineral Nutrient Uptake During Hairy Root Growth of Red Beet (*Beta Vulgaris* L.) in Liquid Culture". *Plant Growth Regulation*. 39:187-193.

- SIROIS, J. 1997. *Optimisation de la croissance de cellules d'Eschscholtzia californica en bioréacteur*. Mémoire de maîtrise. École Polytechnique de Montréal.
- SIROIS, J. 2000. *Modélisation et optimisation en continu d'un procédé de culture de cellules végétales*. Thèse de doctorat. Université de Montréal.
- SMITH, F.W., MUDGE, S. R., RAE, A. L., GLASSOP, D. 2003. "Phosphate Transport in Plants". *Plant and Soil*. 248: 71-83.
- STURM, A., TANG, G. Q. 1999. "The Sucrose-Cleaving Enzymes of Plants Are Crucial for Development, Growth and Carbon Partitioning". *Trends Plant Sci.* 4:10: 401-407.
- TAIZ, L., ZEIGER, E. 1998. *Plant Physiology*. Sunderland. Ed. Sinauer Associates Inc. 448.
- TAKEDA, T., TAKEUCHI, Y., SEKI, M., FURUSAKI, S., MATSUOKA, H. 1998. "Kinetic Analysis of Cell Growth and Vitamin E Production in Plant Cell Culture of *Carthamus Tinctorius* Using a Structured Model". *Biochemical Engineering Journal*. 1:233-242.
- TANNER W., CASPARI, T. 1996. "Membrane Transport Carriers". *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47:596-626.
- TERRY N. 1977. "Photosynthesis, Growth and the Role of Chloride". *Plant Physiology*. 60: 69-75.

- TIKHOMIROFF, C. 2001. *Étude des métabolismes primaire et secondaire de racines transformées de Catharanthus roseus en vue du développement d'un modèle cinétique*. Mémoire de maîtrise, École Polytechnique de Montréal.
- VAN GULIK W.M., TEN HOOPEN, H. J. G., HEIJNEN, J. J. 1993. "A Structured Model Describing Carbon and Phosphate Limited Growth of *Catharanthus roseus* Plan Cell Suspensions in Batch and Chemostat Culture". *Biotechnology and Bioengineering*. 41:8. 771-780
- VERPOORTE R., VAN DER HEIJDEN, R., MEMELINK, J. 2000. "Engineering the Plant Cell Factory for Secondary Metabolite Production". *Transgenic Research*. 9:4. 323-343
- WANG, H.L., LEE, P. D., LIU, L. F., SU1, J. C. 1999. "Effect of sorbitol induced osmotic stress on the changes of carbohydrate and free amino acid pools in sweet potato cell suspension cultures". *Bot. Bull. Acad. Sin.* 40:219-225.
- WANG M.Y., SIDDIQI, M. Y., RUTH, T. J., CLASS, A. M. 1993. "Ammonium Uptake by Rice Roots". *Plant Physiol.* 103: 1259-1267.
- WEISS, P. B. 1966. *Éléments de biologie*. Montréal. Ed. Mcgraw-Hill. 578.
- WILIAMS, L E., Lemoine, R., Sauer, N. 2000. "Sugar transporters in higher plants: a diversity of roles and complex regulation. *Trends in plant science*. 5:8, 283-290.



- WILLIAMS L.E., MILLER, A. J. 2001. "Transporters responsible for the uptake and partitioning of nitrogenous solutes". *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52: 659–688.
- WINK, M. 1997. *Special Nitrogen Metabolism*. San Diego. Ed. Academic Press Limited. 439.
- YANG H., MATSUBAYASHI, Y. 2001. "Diversity of Arabidopsis Genes Encoding Precursors for Phytosulfokine, a Peptide Growth Factor". *Plant Physiology*. 127:842–851.
- YEN E., CHEN, Y.-C., YEN, S.-K., LIN, J.-H. 1999. "Sugar Uptake by Photomixotrophic Soybean Suspension Cultures". *Bot. Bull. Acad. Sin.* 40: 147-152.
- ZHANG N., MACKOWN, C. 1993. "Nitrate Fluxes and Nitrate Reductase Activity of Suspension-Cultured Tobacco Cells". *Plant Physiol.* 102:851-857.

## Annexe A : Suivi des sous cultures et composition du milieu de culture.

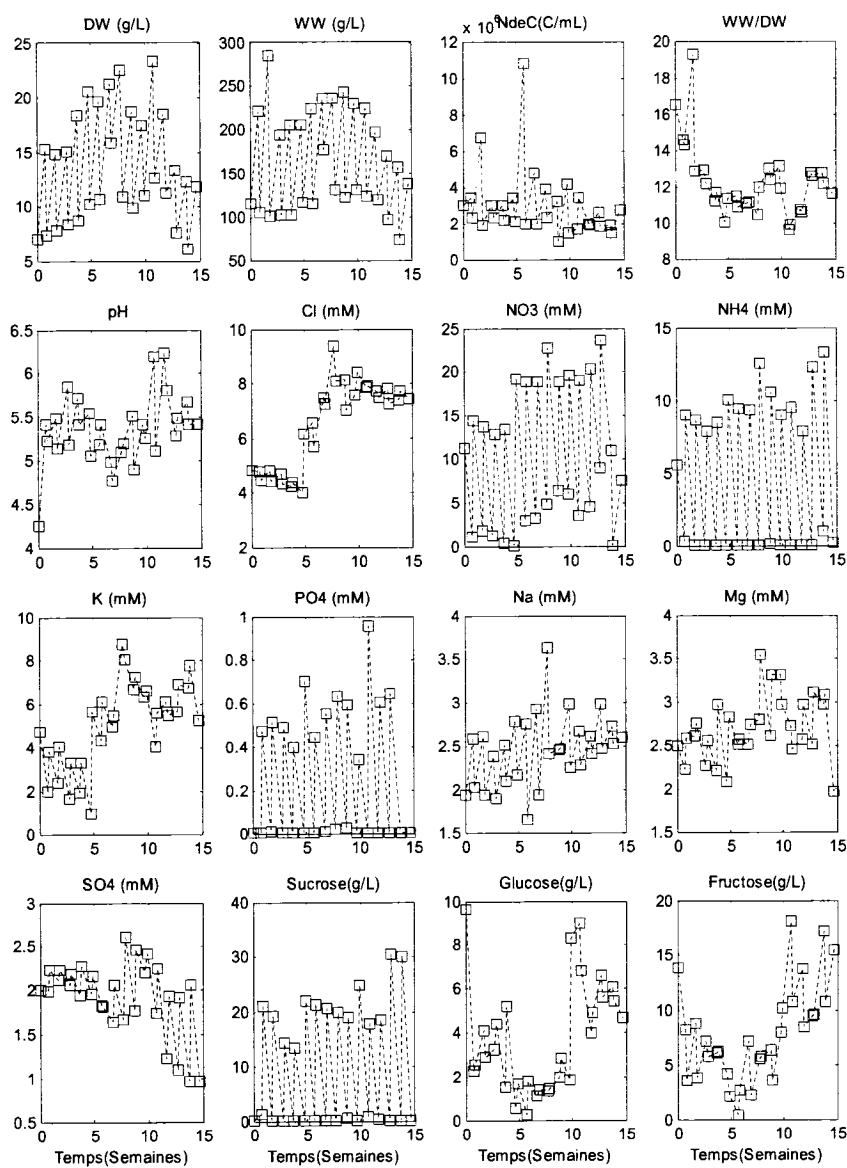


Figure A-1 : Suivi des sous cultures.

**Tableau A-1 : Composition du milieu de culture**

<b>Macronutriments</b>	
KNO <sub>3</sub>	5 mM
CaCl <sub>2</sub> .2 H <sub>2</sub> O	1.5 mM
MgSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O	1.25 mM
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.75 mM
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	12 mM
NaCl	0.5 mM
Sucrose	20 g/L
<b>Micronutriments</b>	
KI	4.5 µM
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	50 µM
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	60 µM
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	7.0 µM
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	1.0 µM
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0.1 µM
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.1 µM
EDTA - Ferric salt	100 µM
<b>Vitamines</b>	
Inositol	100 mg/L
Nicotinic acid	1.0 mg/L
Pyridoxine.HCl	1.0 mg/L
Thiamine.HCl	10.0 mg/L
<b>Hormones</b>	
NAA	2 mg/L
Kinéline	0.1

## Annexe B: Données bruts des cultures de l'étude de l'oxygène dissous – Bioréacteurs 4L

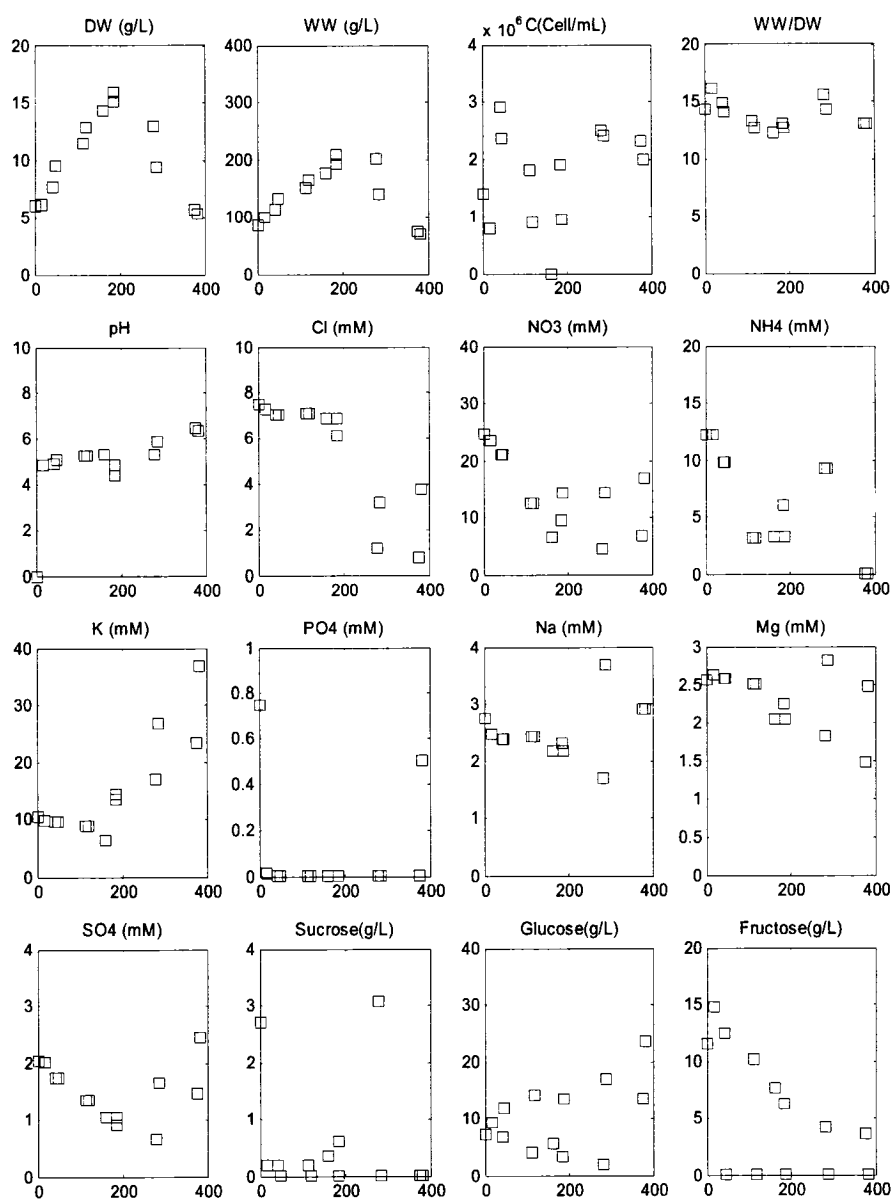
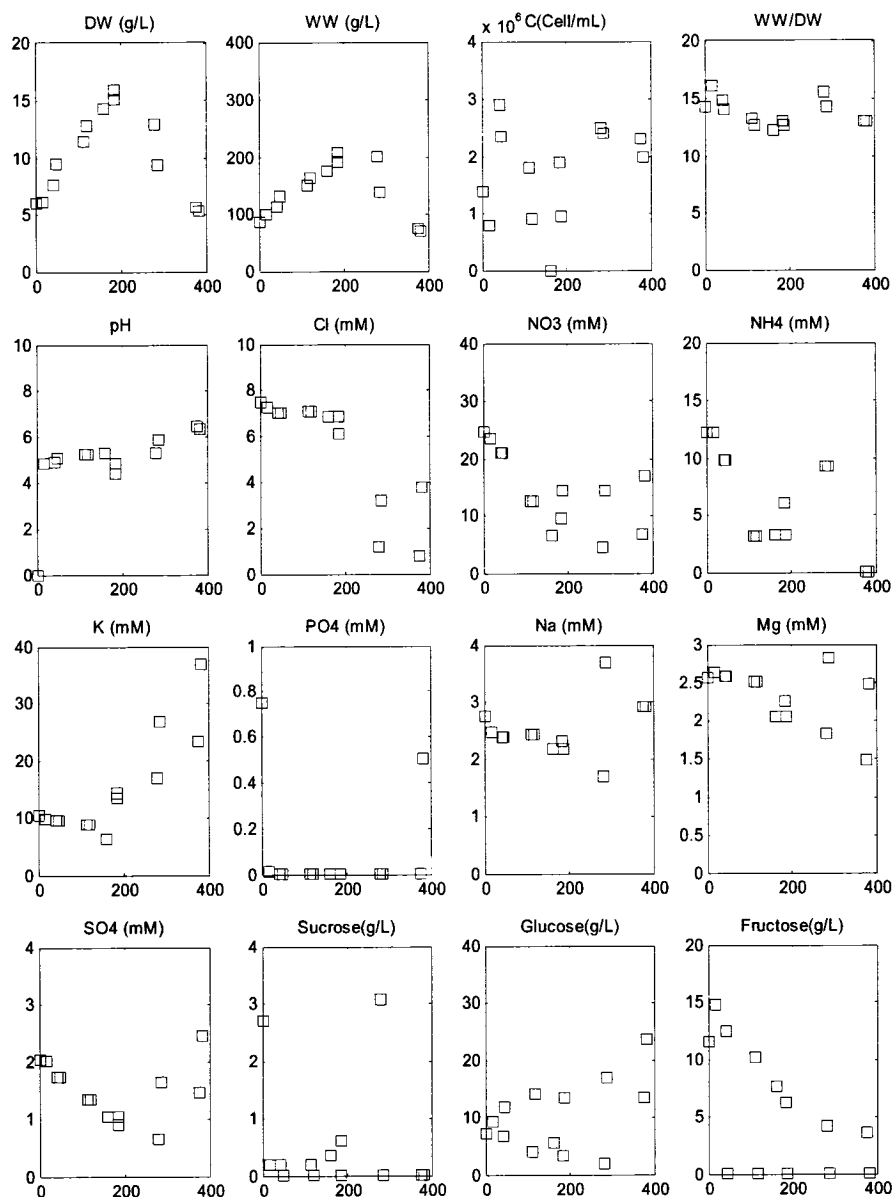
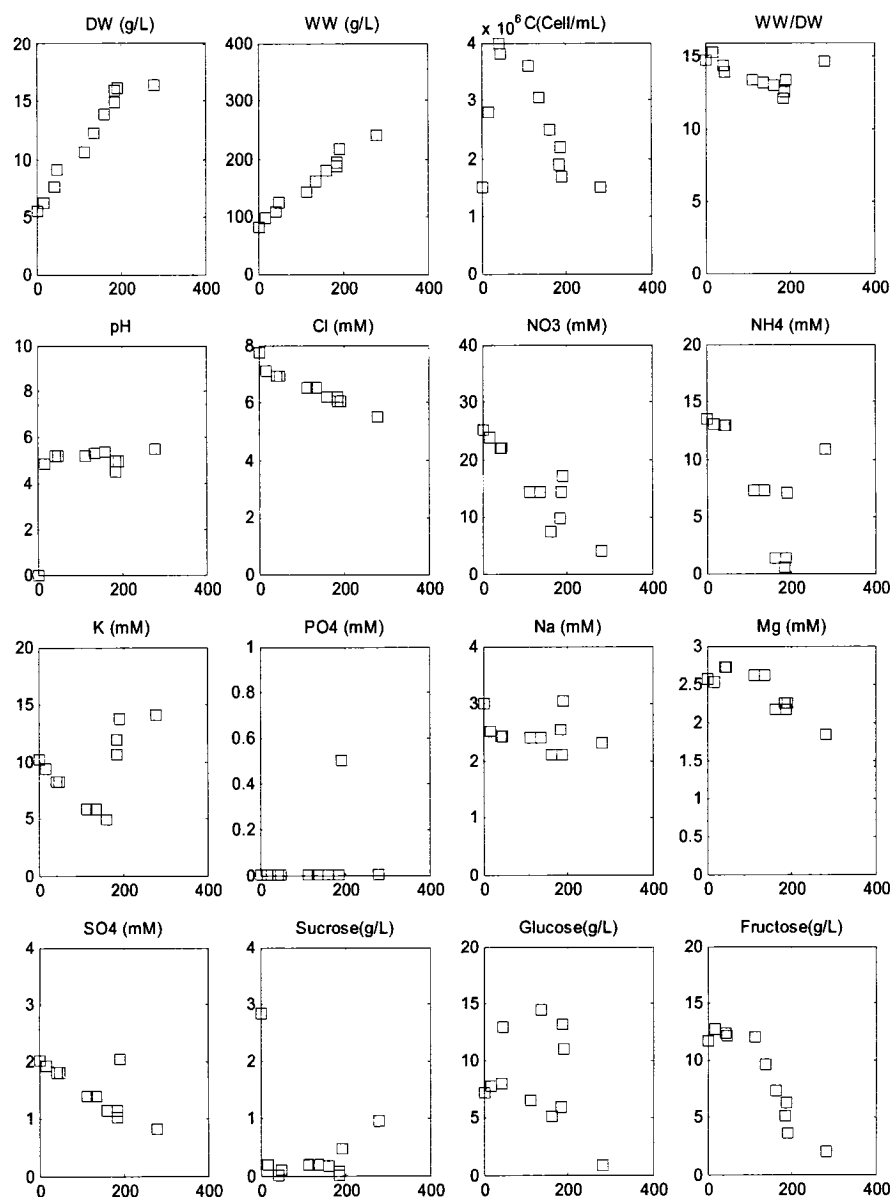


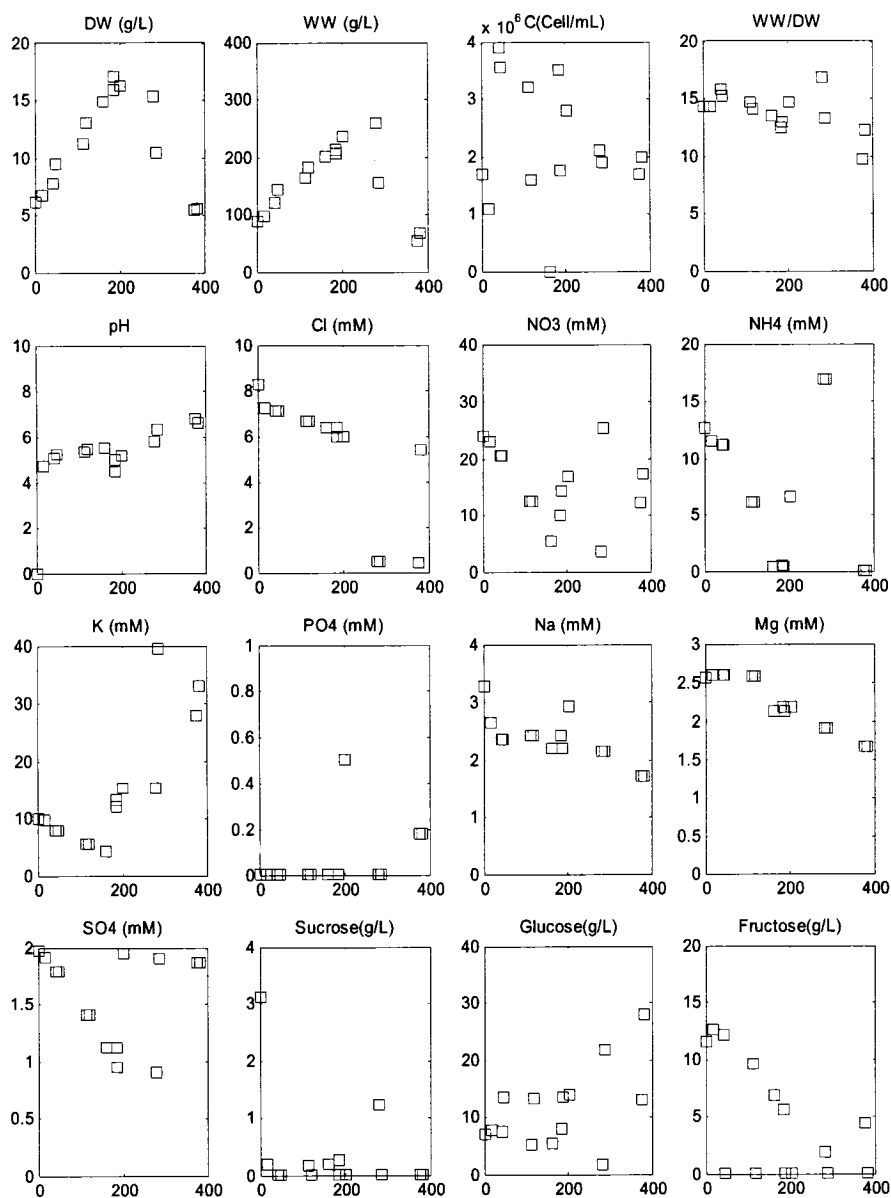
Figure B-2: Données bruts de la culture à 1.5% OD



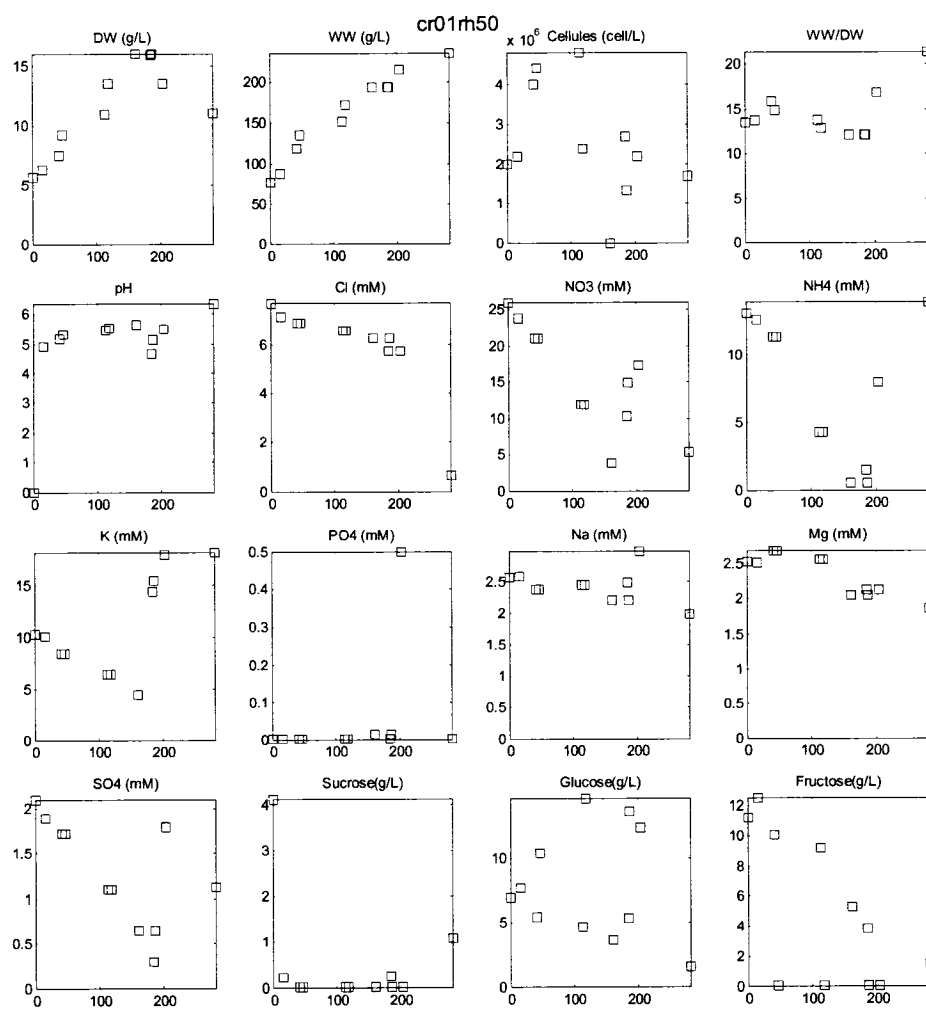
**Figure B-3:** Données brutes de la culture à 30% OD



**Figure B-4:** Données bruts de la culture à 60% OD



**Figure B-5:** Données brutes de la culture à 120% OD



**Figure B-6:**Données bruts de la culture à 180% OD



### Annexe C: Données bruts des cultures de la cinétique de croissance en glucose– Bioréacteurs 4L

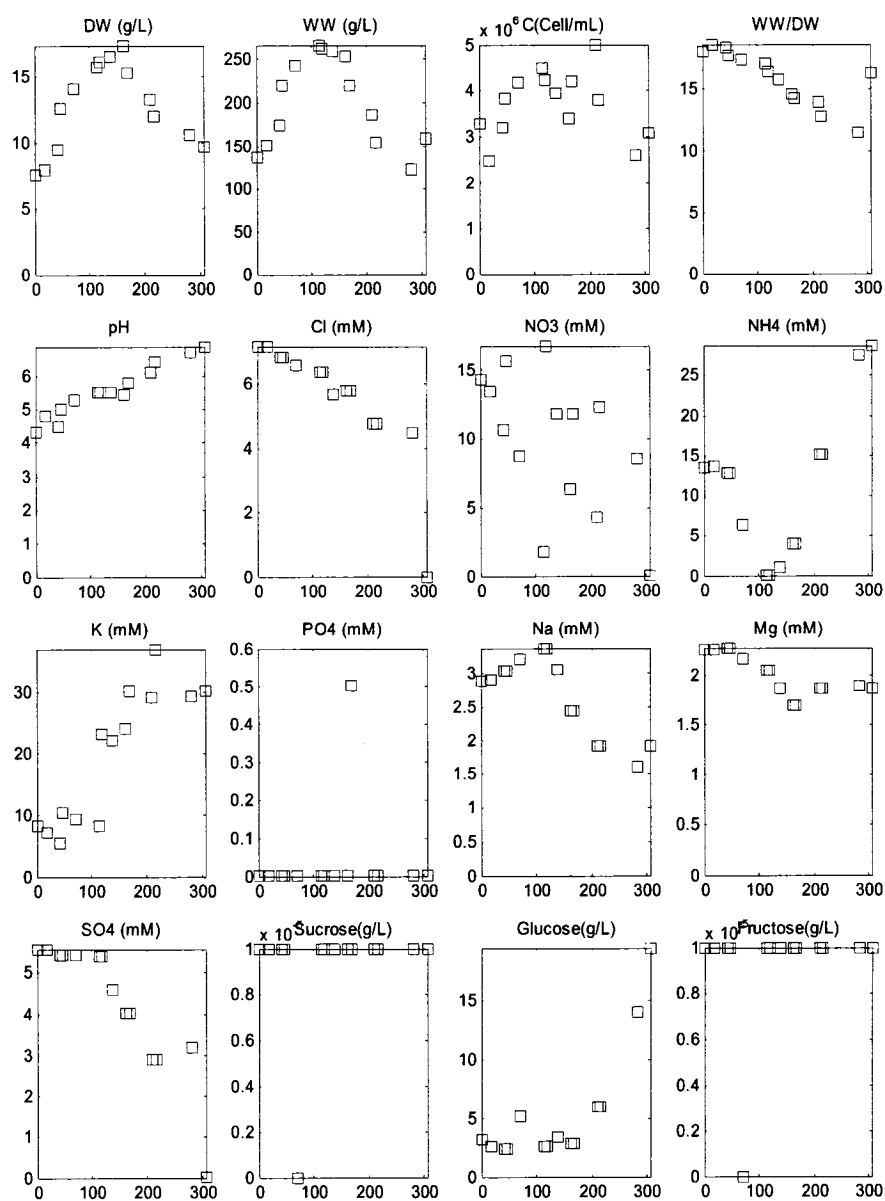
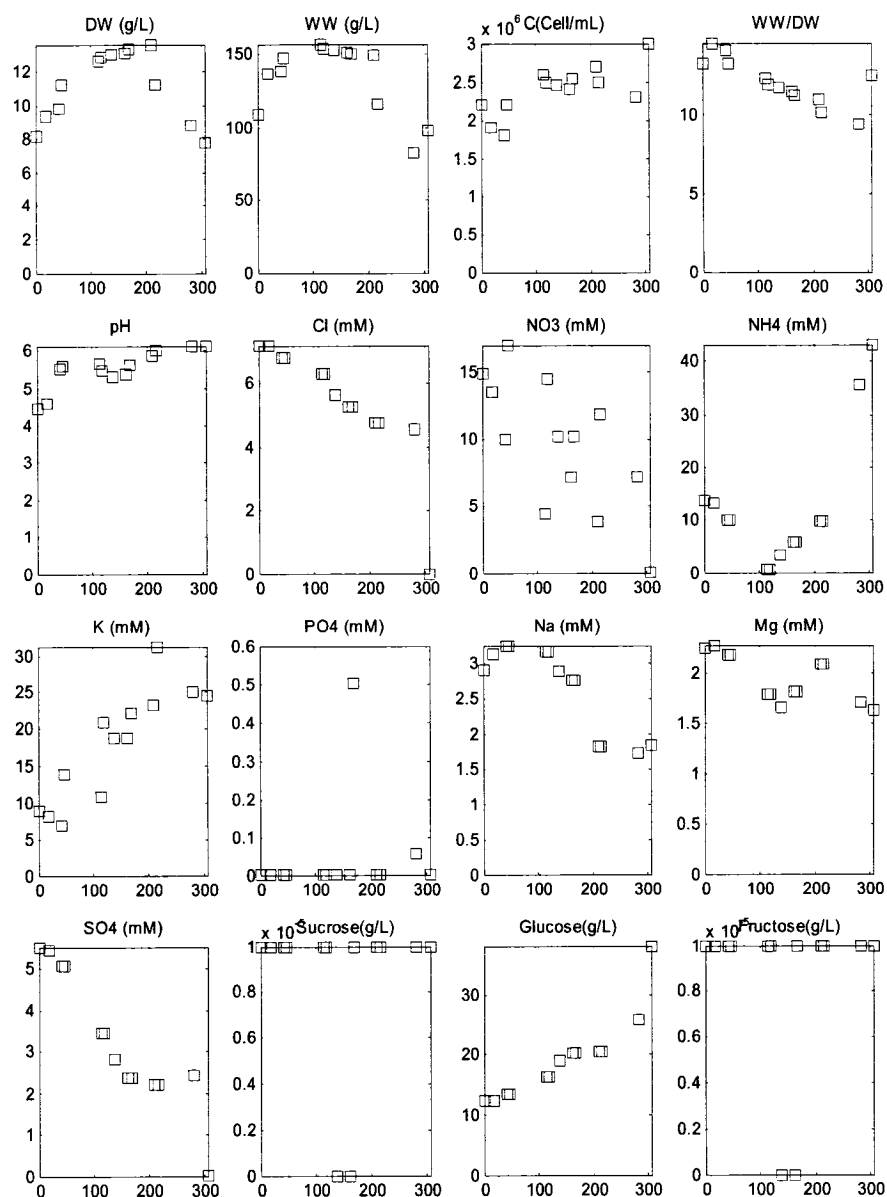
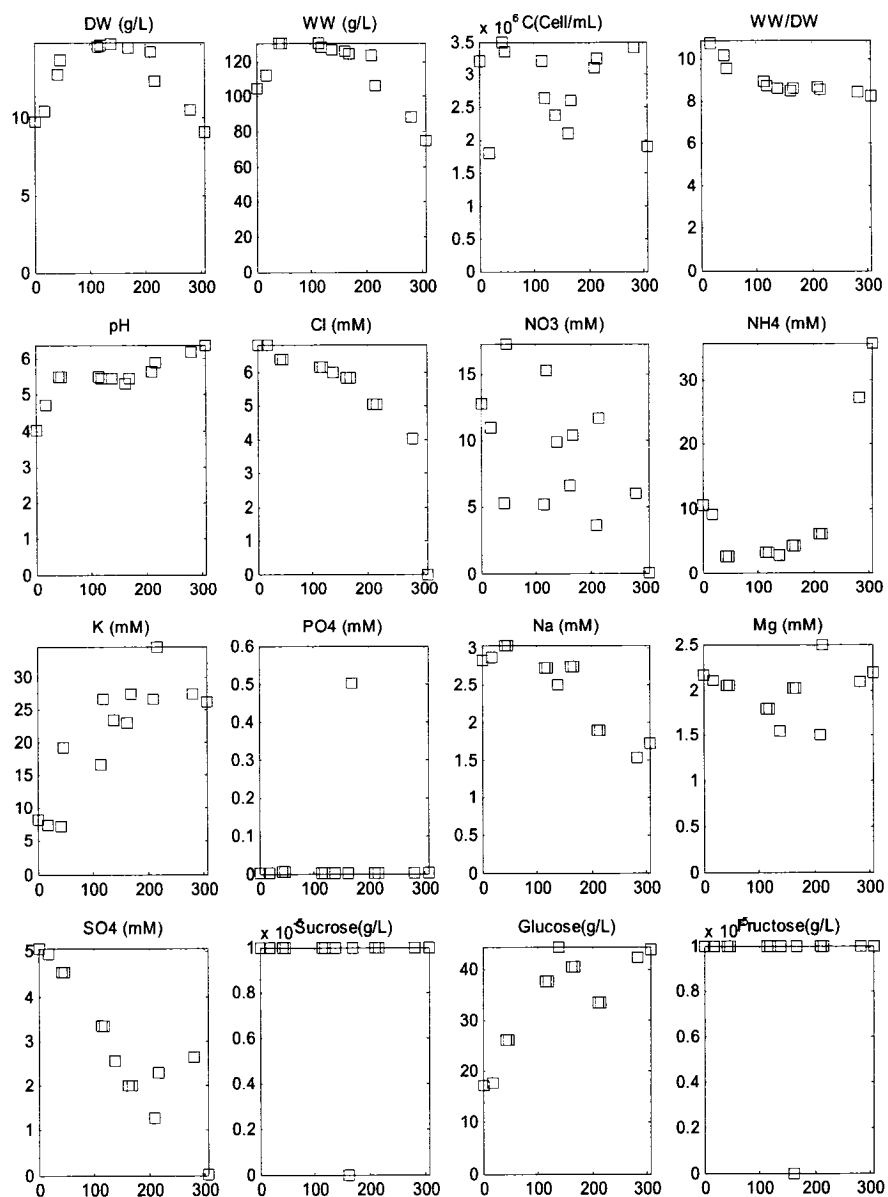


Figure C.1: Données bruts de la culture à 5 g/L de glucose.

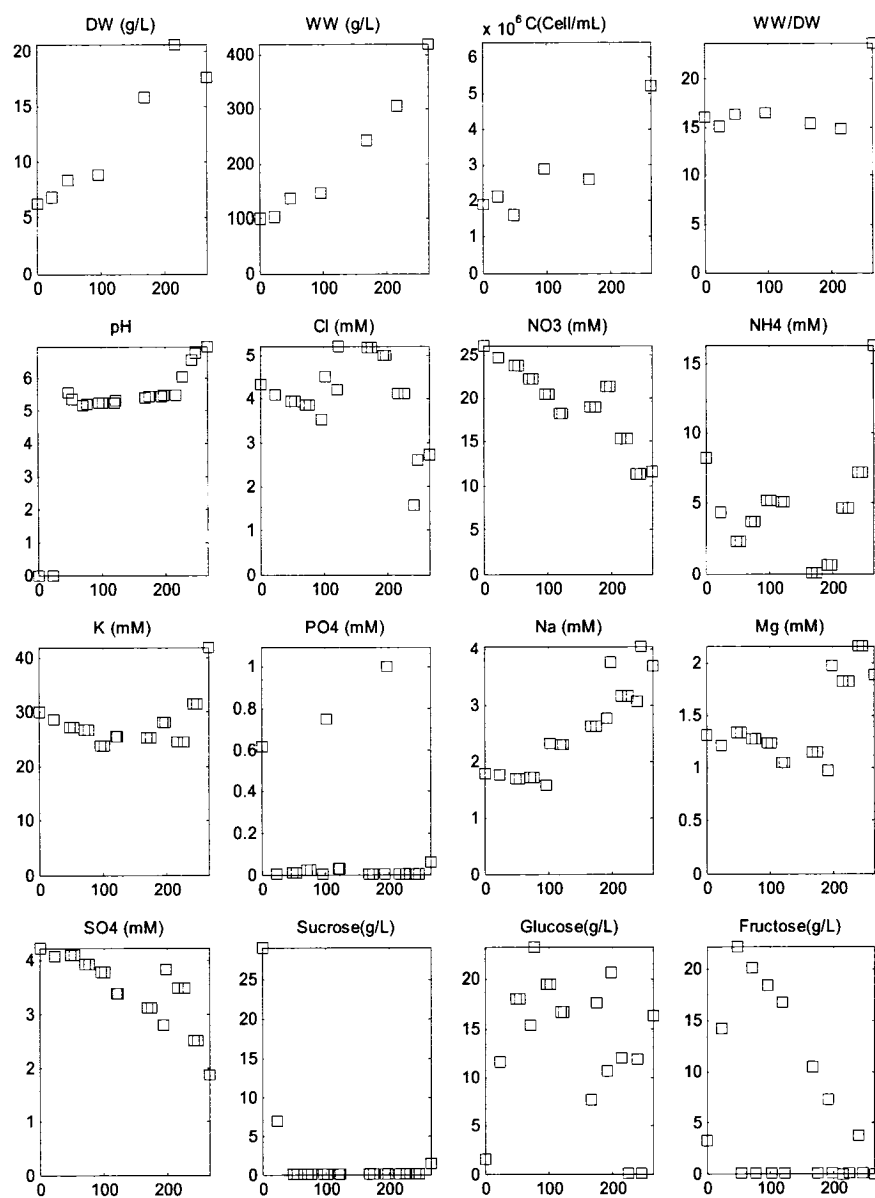


**Figure C.2 :** Données bruts de la culture à 30 g/L de glucose.

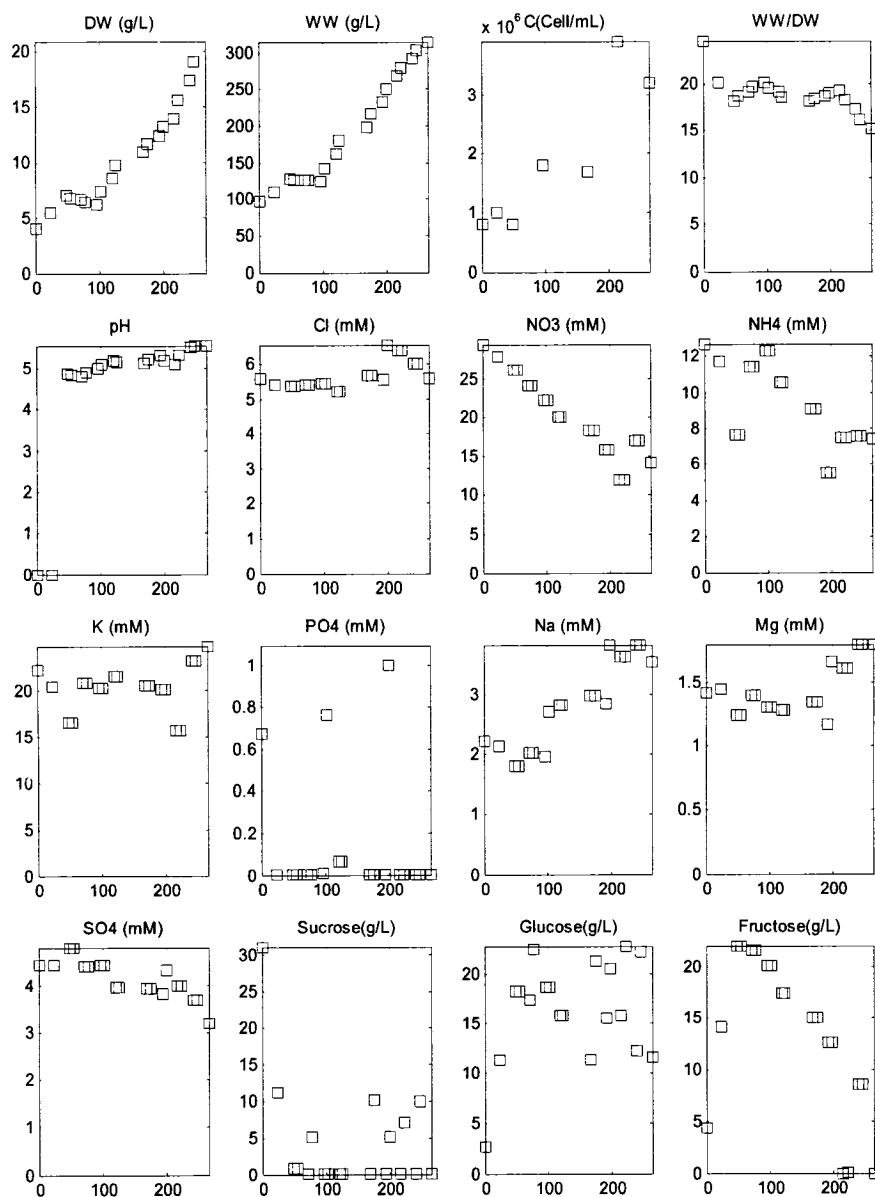


**Figure C.3 :** Données bruts de la culture à 60g/L de glucose.

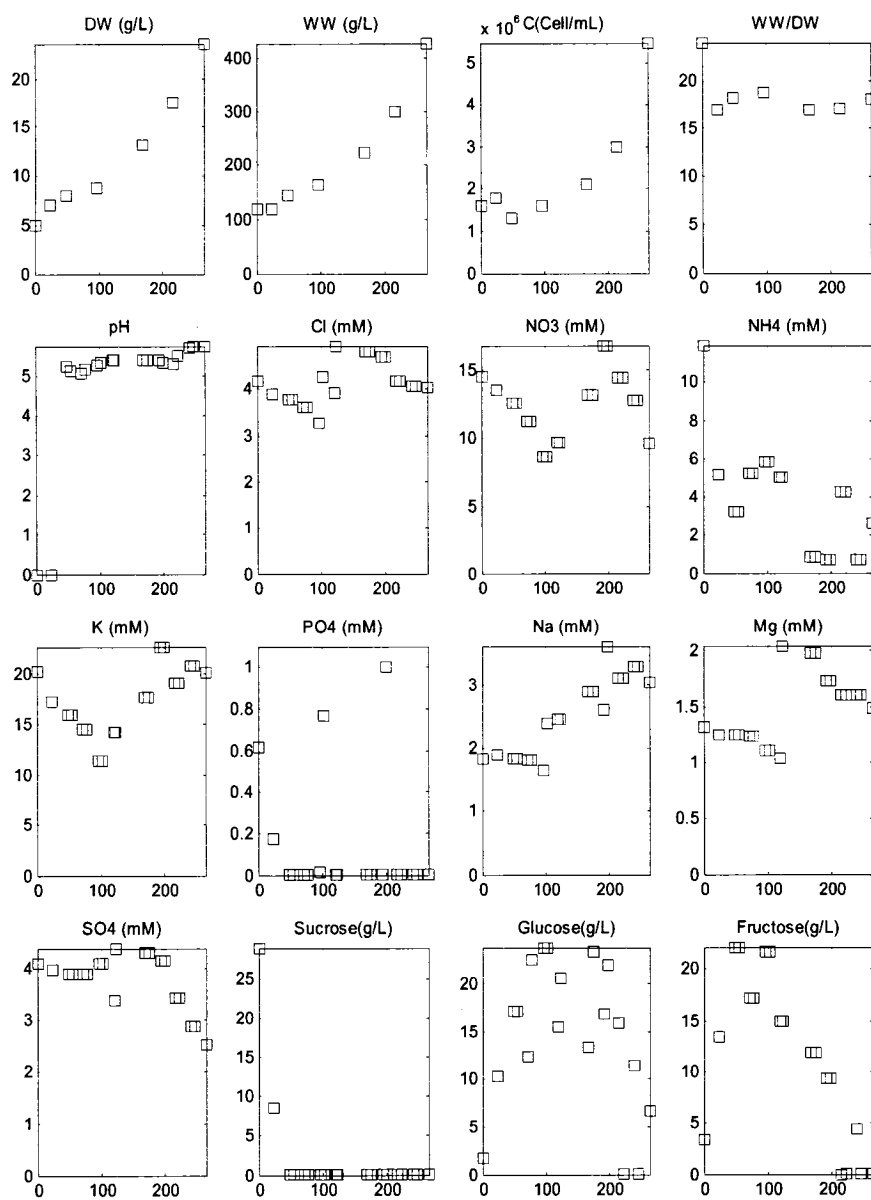
## Annexe D: Données bruts des cultures des cinétiques de croissance en azote– Bioréacteurs 4L



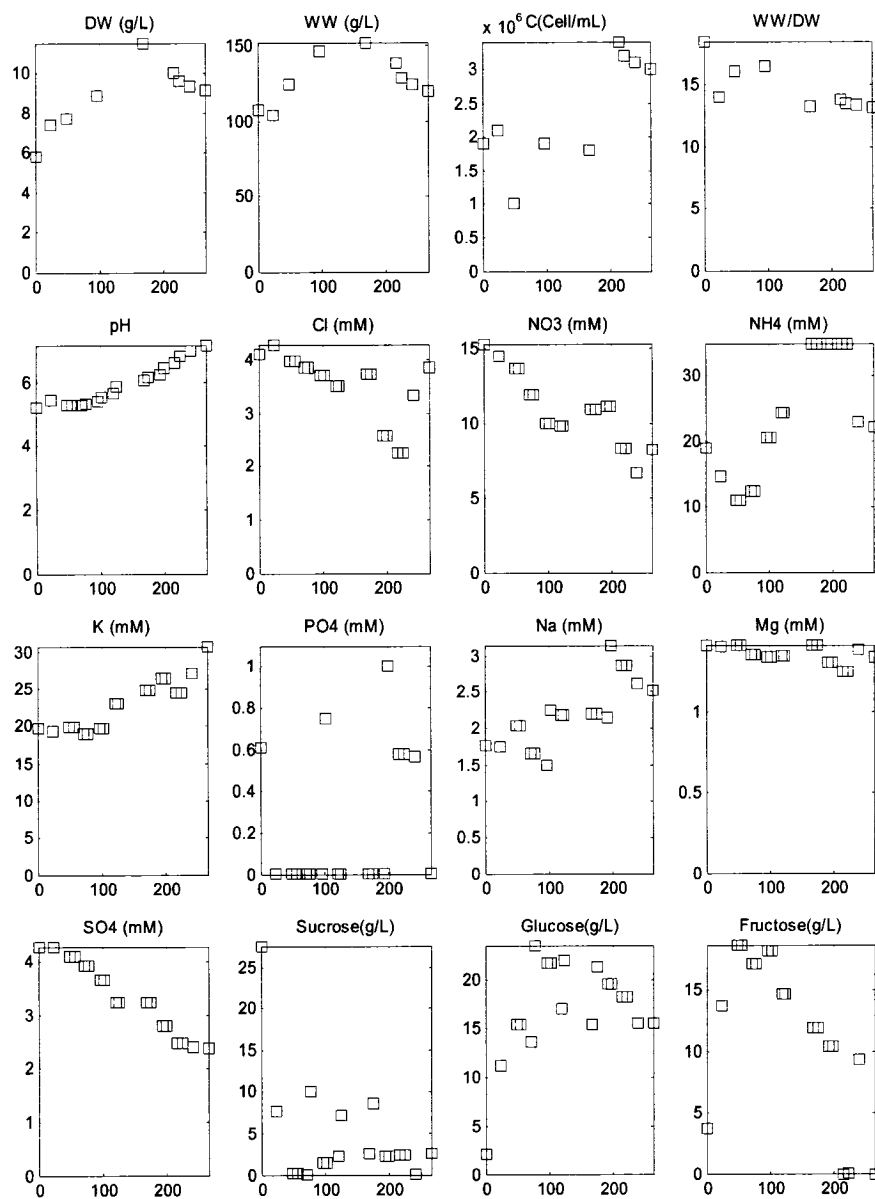
**Figure D.1 :** Données bruts de la culture à 22 mM de nitrate et 4 mM d'ammonium.



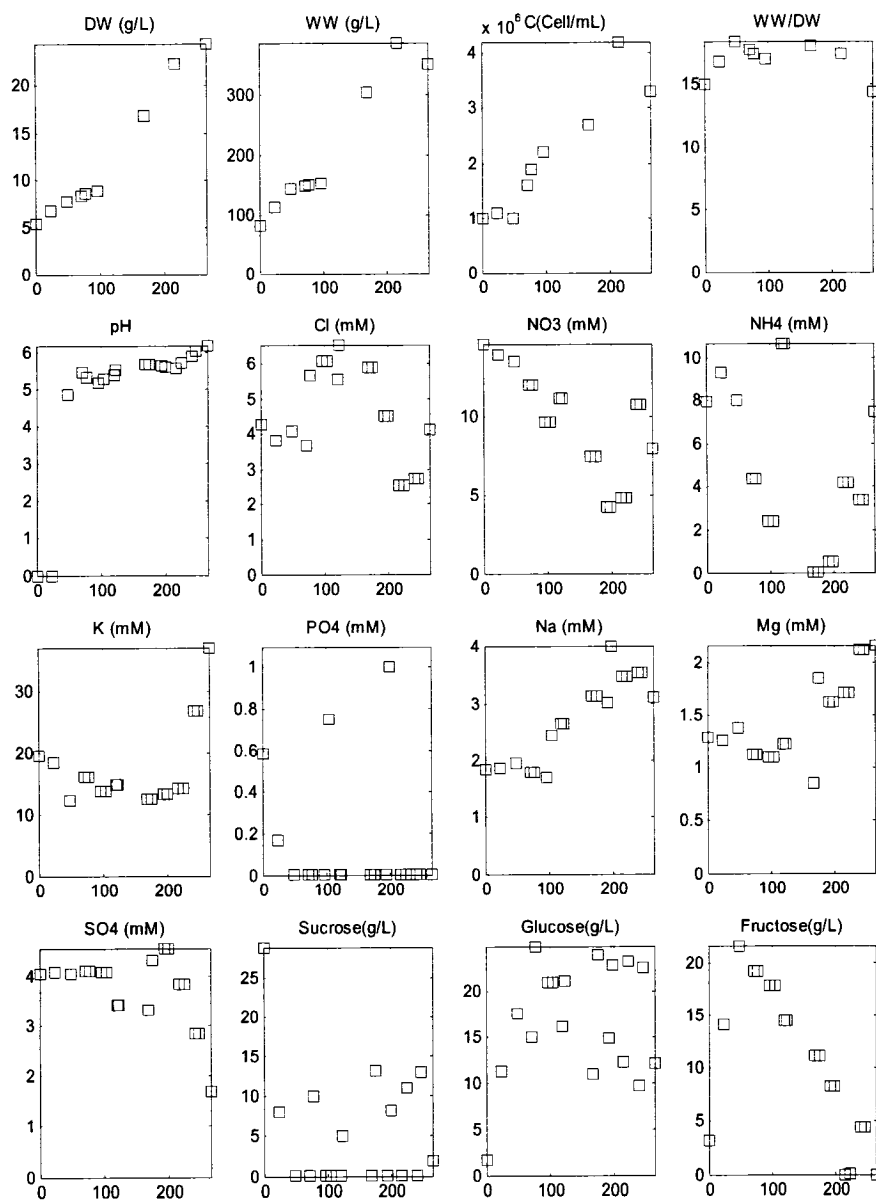
**Figure D.2:** Données brutes de la culture à 23 mM de nitrate et 10 mM d'ammonium.



**Figure D.3:** Données bruts de la culture à 13 mM de nitrate et 5 mM d'ammonium.



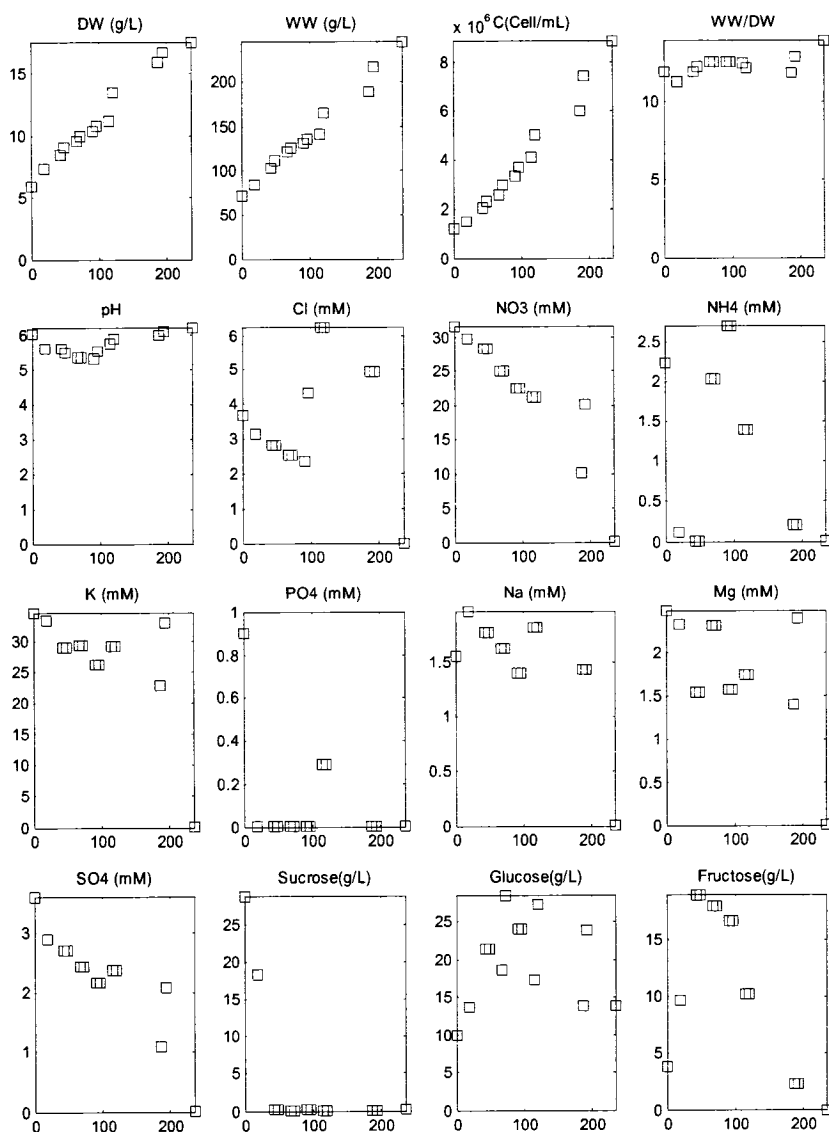
**Figure D.4:** Données bruts de la culture avec surdose d'ammonium.



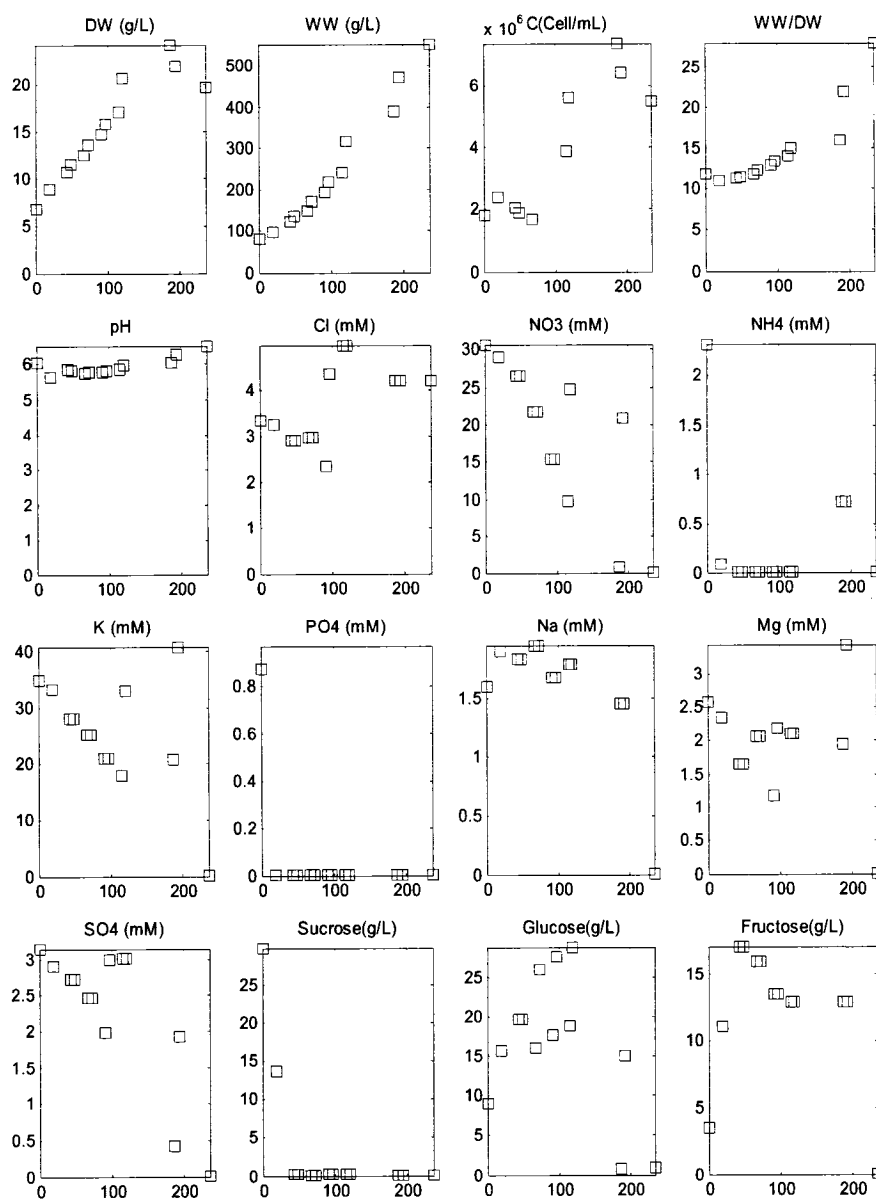
**Figure D.5:** Données bruts de la culture sans surdose d'ammonium.



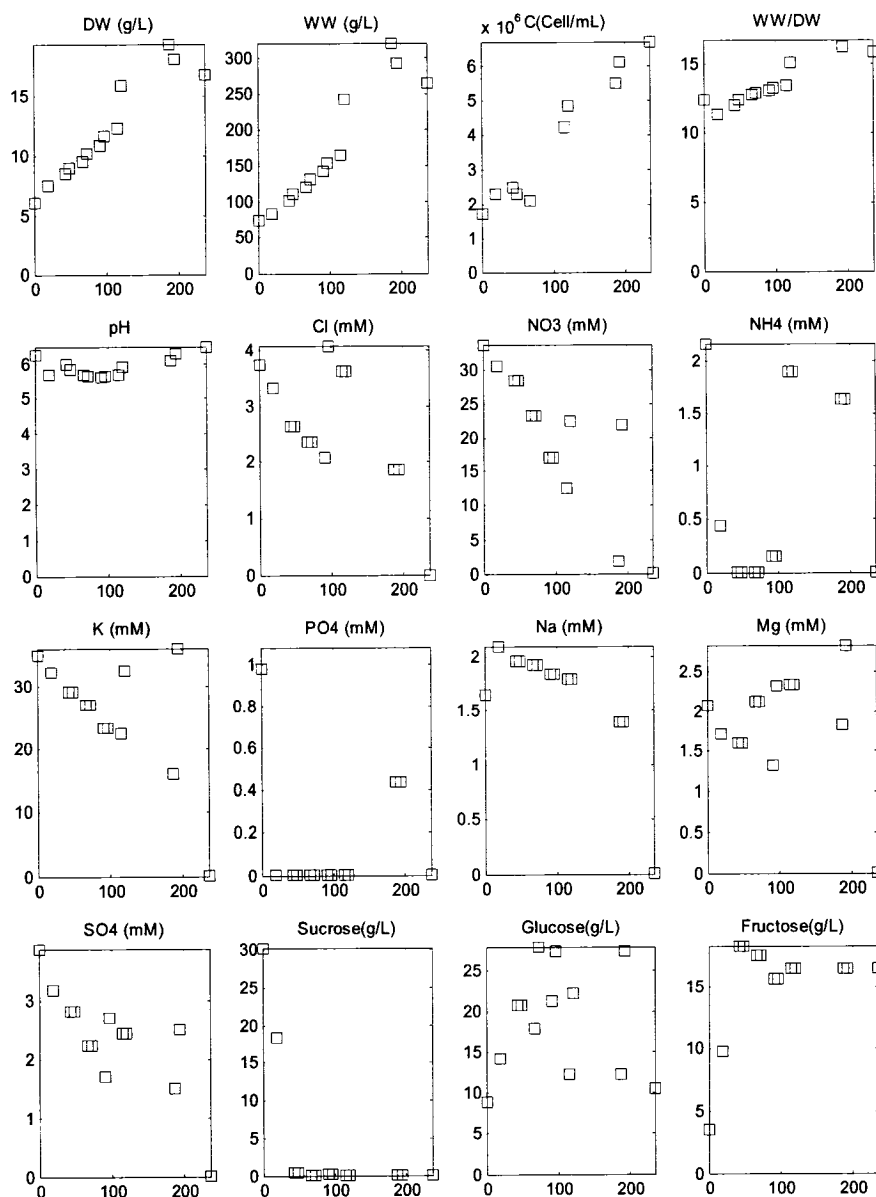
## Annexe E: Données bruts des cultures des cinétiques de croissance en phosphate– Bioréacteurs 4L



**Figure E.1:** Données bruts de la culture avec 0.07 mmol/ gDW de phosphate intracellulaire.



**Figure E.2 :** Données bruts de la culture avec 0.08 mmol/ gDW de phosphate intracellulaire.



**Figure E.3:** Données brutes de la culture avec 0.12 mmol/ gDW de phosphate intracellulaire.

## Annexe F: Routines Matlab

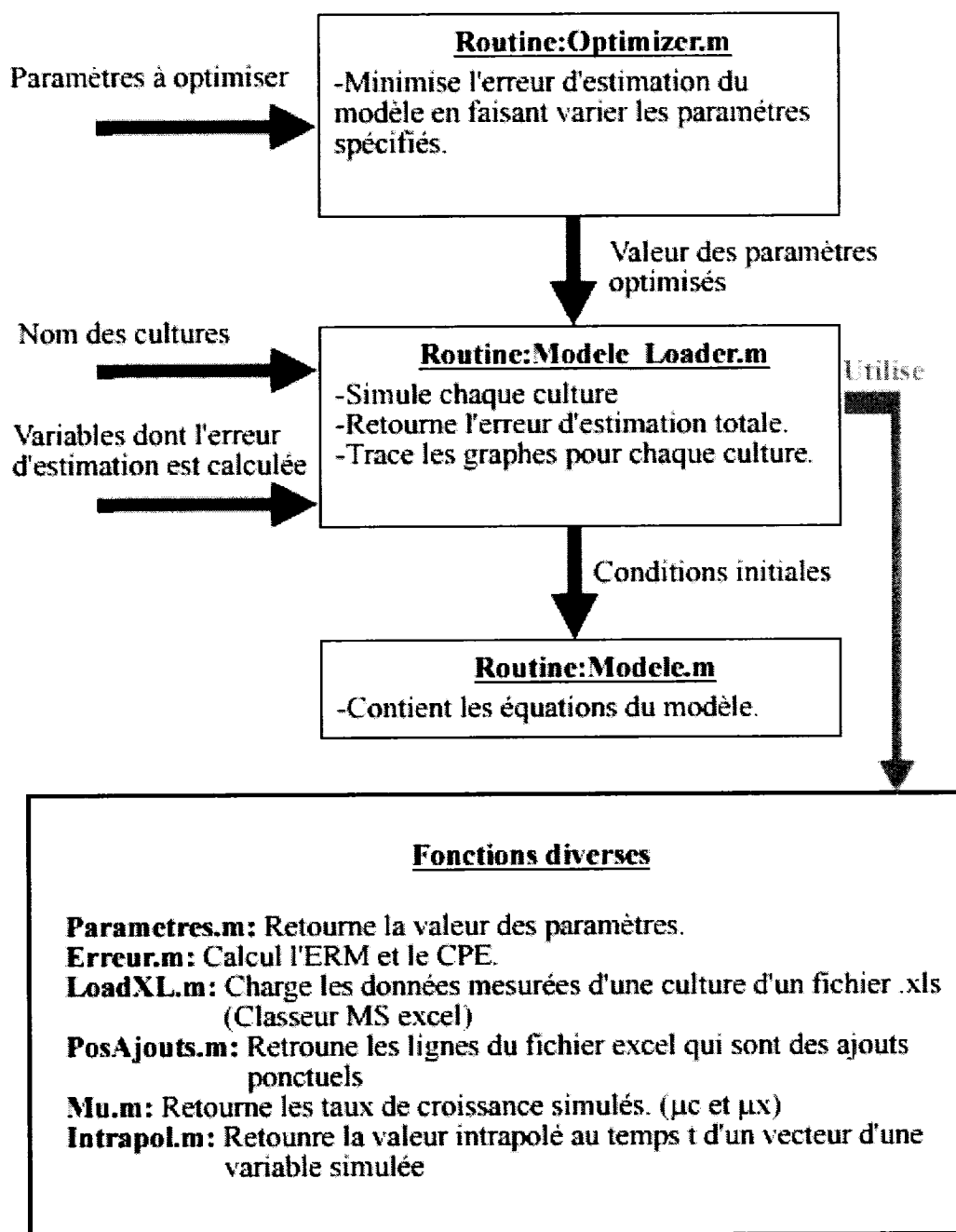


Figure F.1: Hiérarchie des routines utilisées lors les simulations numériques.

### **Optimizer.m**

```
%Procédure qui permet d'optimiser des paramètres simultanément ou
%individuellement en minimisant l'erreur entre le modèle et les données
%expérimentales a l'aide de fminsearch.

clear;

global CPE
global ERM
CPE=[];
ERM=[];

%Vecteur qui contient les indices des paramètres à optimiser (voir fonction
%parametres.m pour la liste des indices)
%*****VARIABLE À INSCRIRE MANUELLEMENT*****
Indices=[**Entrer les indices de paramètres à optimiser ici**];
% exemple: Indices=[1 10 11 12]

%Options de fminsearch
options=optimset('MaxIter',50,'Display','iter');

%Valeur des paramètres initiaux (lus dans parametres.m)
Param=Parametres;
for i=1:size(Indices,2)
    parametres_initiaux(i)=Param(Indices(i));
end

%Fonction d'optimisation
[parametres, erreur, exitflag,
output]=fminsearch('modeleloader',parametres_initiaux,options,Indices);

%Affiche la valeur des paramètres initiaux et les paramètres optimisé
OUT=[Indices; parametres_initiaux; parametres]

%Calcul et affiche le temps de calcul de l'optimisatoir
tempsrun=cputime-t
```

## **Modeleloader.m**

```

function [sol, val]=modeleloader(ValParam,IndiceParam)
% Cette fonction a 2 rôles:
% 1-Appelée sans arguments elle simule les cultures
% spécifiées dans le vecteur "cultures" et affiche les graphiques de chacune d'elle.
% 2-Appelée par optimizer.m elle permet de minimiser l'erreur d'estimation en faisant
% varier des
% paramètres choisis par l'utilisateur.
%
% ValParam - Vecteur qui contient les valeurs des paramètres à optimiser
%
% IndiceParam - Identification du paramètre à optimiser.
% Indique l'indice du paramètre à optimiser (voir
% la fonction parametre.m).
%
% Note: ValParam et IndiceParam doivent être des vecteurs de même
% taille. ex. ValParam(i) est la valeur du paramètre
% identifier par IndiceParam(i)
%

%Déclarations et initialisation
global CPE
global ERM
emoy=0;
Epv=0;
erreur=0;

%Chargement des parametres du modèle
if nargin==0
    %si pas d'optimisation, charge les valeurs des paramètres contenus dans la %fonction
    parametres.m
    Param=parametres;
elseif nargin==2
    %si optimisation, remplace la valeur des Parametres IndiceParam par les valeurs
    contenus dans ValParam
    Param=parametres(ValParam,IndiceParam);
end

%cultures - Vecteur qui contient le nom des cultures traitées

%*****VARIABLE À MODIFIER MANUELLEMENT*****
cultures={INSCRIRE LE NOM DES FICHIERS EXCEL (PAS DE .XLS) CONTENANT LES CULTURES
ANALYSÉES ICI}
%Ex.:cultures=['culture_1';'culture_2';'culture_3'];

%Détermine le nombre de culture a traiter
NbrCulture=size(cultures,1);

%Boucle qui traite chaque culture
for i=1:NbrCulture

%Charge les données expérimentales pour la culture i
NdeC=loadXL(cultures(i,:), 'NdeC');
ww=loadXL(cultures(i,:), 'WW');
t=loadXL(cultures(i,:), 't');
dw=loadXL(cultures(i,:), 'DW');
NO3=loadXL(cultures(i,:), 'NO3');
NH4=loadXL(cultures(i,:), 'NH4');
PO4=loadXL(cultures(i,:), 'PO4');
s=loadXL(cultures(i,:), 'SUC');
g=loadXL(cultures(i,:), 'GLUC');
f=loadXL(cultures(i,:), 'FRUC');
no=loadXL(cultures(i,:), 'no');
SO4=loadXL(cultures(i,:), 'SO4');

```

```

Pg=loadXL(cultures(i,:), 'Pg');
PNO3=loadXL(cultures(i,:), 'PNO3');
PNH4=loadXL(cultures(i,:), 'PNH4');
PPO4=loadXL(cultures(i,:), 'PPO4');

```

```

%Détermine les indices où il y a des ajouts ponctuels avec la FONCTION PosAjouts.
%le premier chiffre du vecteur est 1(premier échantillon) le dernier est le
%dernier index de la culture.

```

```

Ajouts=PosAjouts(t,no);

```

```

%Détermine le nombre d'ajouts de la culture (=Nombre d'ajouts+2)
NbrAjouts=size(Ajouts);
NbrAjouts=NbrAjouts(2);

```

```

%Boucle qui gère les parties de la culture traitée (une partie de
%culture se compose soit de tous les échantillons qui se situent entre 2
%ajouts, du départ de la culture jusqu'au premier ajout ou du dernier ajout
%jusqu'à la fin de la culture.
%Si il n'y a pas d'ajout, la culture est traitée comme une seule partie
for part=1:NbrAjouts-1

```

```

    %Construction de l'intervalle de temps de la partie traitée (t0 à
    %t1-0.001 h)
    temps=[t(Ajouts(part)) t(Ajouts(part+1))];% -0.0001];

```

```

    %Débits des pompes d'ajout
    QNO3=PNO3(Ajouts(part));
    QNH4=PNH4(Ajouts(part));
    Qg=Pg(Ajouts(part));
    QPO4=PPO4(Ajouts(part));

```

```

    %options de ode15s
    options = odeset('refine',5,'RelTol',1e-4);%

```

```

    %Si c'est la première partie, les données initiales sont celles
    %fournies par les données du premier échantillon

```

```

if part==1

```

```

    %Attribut les conditions initiales de la résolution avec ODE
    NdeCinit=NdeC(Ajouts(part));

```

```

    dwinit=dw(Ajouts(part));
    NO3init=NO3(Ajouts(part));
    NO3iinit=0.01;
    NH4init=NH4(Ajouts(part));
    NH4iinit=0.01;
    PO4init=PO4(Ajouts(part));
    PO4iinit=0.2; %concentration initiale en phosphate estimée
    Sinit=s(Ajouts(part));
    Ginit=g(Ajouts(part));
    Finit=f(Ajouts(part));

```

```

    %si la culture est en flacon, le volume initial =500ml sinon Vi= 2L.
    if cultures(i,6)=='f'
        Vinit=500;
    else
        Vinit=2000;
    end

```

```

    %signale une variable non-utilisée
    dummy=0

```

```

    %Résolution du modèle pour la partie 'part'

```

```

%On passe les conditions initiales et les débits d'ajout.
[Ttemp,Ytemp] = ODE15s('Modele',temps',[dwinit NO3init dummy NH4init
NH4iinit Vinit Sinit Ginit Finit dummy PO4init PO4iinit NdeCinit_
NO3iinit],options,A,B,C,D,Param,QNO3,QNH4,Qg,QPO4);

%Consigne la solution de la partie 'part'
T=Ttemp;
Y=Ytemp;

%Si ce n'est pas la première partie, récupère les dernières données simulée
%de la partie précédente pour conditions initiales de la résolution
else

%Détermine l'index de la dernière donnée de la partie précédente
NbrTemps=size(T);
NbrTemps=NbrTemps(1);

%Attribut les conditions initiales de la résolution avec ODE. Pour
%les ions et les sucres calcule l'ajout à partir des données du
%fichier de la culture et l'ajoute à la dernière valeur simulée de
%la partie précédente (à t=t-0.01 du début de la présente partie)
NdeCinit=Y(NbrTemps,13);
dwinit=Y(NbrTemps,1);
WtoDi=Y(NbrTemps,3);
NO3init=Y(NbrTemps,2)+NO3(Ajouts(part))-NO3(Ajouts(part)-1);
Yiniy=Y(NbrTemps,2);

NO3part=NO3(Ajouts(part));
NO3partavant=NO3(Ajouts(part)-1);
Y(NbrTemps,2)+NO3(Ajouts(part))-NO3(Ajouts(part)-1);
NO3iinit=Y(NbrTemps,3);
NH4init=Y(NbrTemps,4)+NH4(Ajouts(part))-NH4(Ajouts(part)-1);
NH4iinit=Y(NbrTemps,5);
PO4init=Y(NbrTemps,11)+PO4(Ajouts(part))-PO4(Ajouts(part)-1);
PO4iinit=Y(NbrTemps,12);
Sinit=Y(NbrTemps,7);
Ginit=Y(NbrTemps,8)+g(Ajouts(part))-g(Ajouts(part)-1);
Finit=Y(NbrTemps,9);
Suciinit=Y(NbrTemps,14);
Vinit=Y(NbrTemps,6);
NO3iinit=Y(NbrTemps,14);

%Résolution du modèle pour la partie 'part'
[Ttemp,Ytemp] = ODE15s('Modele',temps',[dwinit NO3init WtoDi NH4init
NH4iinit Vinit Sinit Ginit Finit Stotinit PO4init PO4iinit
NdeCinit NO3iinit],options,A,B,C,D,Param,QNO3,QNH4,Qg,QPO4);

%Consigne la solution de la partie 'part'
T=[T;Ttemp];
Y=[Y;Ytemp];
end

end

%Calcul des erreurs
[ek,epv2]=erreur(T,[Y(:,1) Y(:,13)],B,no,t,[dw' NdeC'],i);
Er(i)=ek ;

%si c'est pas un problème de minimisation, trace les graphs et calcul
%les mus (la fonction mu est gourmande en temps de calcul)

if nargin==0

```



```

%Calcul des taux de croissance du modele
[muxmod,mucmod]=mu(T',Y(:,1)',Y(:,13)');

%GRAPHIQUES

figure
set(0,'DefaultFigurePaperPosition',[0 0 8.5 11])

%*****
%Graphique de la biomasse(modèle et échantillons)

subplot(3,3,1)

plot(t,dw,'ko',T,Y(:,1),'k');
ylabel('g/L');
title('DW');
AXIS([0 max(t) 0 1.1*max(max(dw),max(Y(:,1)))])

%Graphique de la concentration cellulaire(modèle et échantillons)
subplot(3,3,2)
plot(t,NdeC,'ko',T,Y(:,13),'k');
ylabel('Cellules/mL');
title('Compte cellulaire');
AXIS([0 max(t) 0 1.1*max(max(NdeC),max(Y(:,13)))])

%mus
subplot(3,3,3)
plot(T,muxmod,'k-',T,mucmod,'k:');
legend('mux','muc');
ylabel('h-1');
title('Taux de croissance');
AXIS([0 max(t) 0.9*min([min(muxmod) min(mucmod)]) 1.1*max([max(muxmod)
max(mucmod)])]);

%Graphique des sucres
subplot(3,3,6)
plot(t,s,'ko',t,g,'k*',t,f,'ks',T,Y(:,7),'k',T,Y(:,8),'k:',T,Y(:,9),'k--
');
legend('S','G','F','S','G','F');
ylabel('g/L');
title('Sources de carbone');
AXIS([0 max(t) 0 1.1*max([max(s) max(g) max(f)])])

%Azote extra
subplot(3,3,4)
plot(t,NH4,'ko',t,NO3,'k*',T,Y(:,4),'k',T,Y(:,2),'k:');
legend('NH4','NO3','NH4','NO3');
ylabel('mM');
title('Azote Extra');
AXIS([0 max(t) 0 1.1*max([max(NH4) max(NO3)])]);

%Graphique de PO4 extra
subplot(3,3,5)
plot(t,PO4,'ko',T,Y(:,11),'k');
ylabel('mM');
title('Phosphate extra');
AXIS([0 max(t) 0 1.1*max(PO4)]);

%Graphique Azote intra
subplot(3,3,7)

```

```

plot(T,Y(:,14),'k',T,Y(:,5),'k:');
legend('NO3i','NH4i');
xlabel('temps(h)');
ylabel('mM/gDW');
title('Azote Intra');
AXIS([0 max(t) 0 1.1*max([max(Y(:,14)) max(Y(:,5))])]);

%Graphique PO4 intra
subplot(3,3,8)
plot(T,Y(:,12),'k');
xlabel('temps(h)');
ylabel('mM/10e6 cellules');
title('Phosphate intra');

suptitle(strcat('C',int2str(i)));
AXIS([0 max(t) 0 1.1*max(Y(:,12))]);

%*****
%Graphique des débits d'ajout seulement si réacteur
if cultures(i,6)=='h'

    subplot(3,3,9)
    plot(t,PNO3,'k',t,PNH4,'k--',t,PPO4,'k:');
    legend('NO3','NH4','PO4');
    xlabel('temps(h)');
    ylabel('mM/j');
    title('Débits ajouts');
    AXIS([0 max(t) 0 1.1*max([max(PNO3) max(PNH4) max(PPO4)])]);
    end
end

%ajoute l'erreur de la culture a l'erreur globale
emoy=emoy+ek;
Epv=Epv+epv2;

end
%calcul l'ERM moyen total
emoy=emoy/NbrCulture;
Er(i)=emoy;

%Retourne l'Epv pour optimiser et la valeur des paramètres optimisés
if nargin>0
    sol=Epv;
    val=ValParam;
else

%Graphique de L'ERM pour chaque culture
figure
bar(Er)
Er
xlabel('Numéro de la culture');
ylabel('ERM (%)');

```

### **Modele.m**

```

function out=Modele(t,y,flag,A,B,Cfit,D,P,QNO3,QNH4,QG,QPO4);

%Valeur des variables
Cfgluc=600;
CfNO3=1000;
CfNH4=1000;
CfPO4=25;
X=y(1);
NO3=y(2);

```

```

WtoD=y(3);
NH4=y(4);
NH4i=y(5);
V=y(6);
S=y(7);
G=y(8);
F=y(9);
Stot=F+G;
PO4=y(11);
PO4i=y(12);
C=y(13);
Ni=y(14);
P=abs(P);

out = zeros(14,1);

%Calcul de variation du volume(L/h)
dVdt=V*(QNO3/24/CfNO3+QNH4/24/CfNH4+QPO4/24/CfPO4+QG/24/Cfgluc);
out(6)=dVdt;

%Calcul du taux de dilution
Dilution=1/V*(0.100/24+dVdt);

%Taux de croissance Biomasse
mux=P(23,1)*(Stot/(Stot+P(25,1)))*(NO3+NH4)/((NO3+NH4)+P(26,1))*PO4i/(0.001+PO4i)*P(30,1)/
(P(30,1)+(NH4)^P(31,1));
dXdt=mux*X;
out(1)=dXdt-Dilution*X;%

%Taux de croissance Cellules
muc=P(24,1)*(Stot/(Stot+P(34,1)))*(NO3+NH4)/((NO3+NH4)+P(26,1))*PO4i/(PO4i+P(36,1))*P(39,1)/
(P(39,1)+(NH4)^P(40,1));
dCdt=muc*C-Dilution*C;
out(13)=dCdt-Dilution*C;

%NO3
dNO3dt=-P(11,1)*NO3*X-NO3*P(12,1)/(P(13,1)+NO3)*X;
out(2)=dNO3dt+QNO3/24-Dilution*NO3;

%NH4
dNH4dt=-P(15,1)*NH4*X-NH4*P(16,1)/(P(17,1)+NH4)*X;
out(4)=dNH4dt+QNH4/24-Dilution*NH4;

%Azote intra
dNO3idt=(-dNO3dt/C/1000-P(19,1)*dCdt/2/C)*C*1000/X;
dNH4idt=(-dNH4dt/C/1000-P(19,1)*dCdt/2/C)*C*1000/X;
out(14)=dNO3idt;
out(5)=dNH4idt;

%Sucrose
dSdt=-P(2,1)*S/(S+P(3,1))*X;
out(7)=dSdt;

%Glucose
dGdt=-P(4,1)*G/(G+P(5,1)*(1+F/P(6,1)))*X;%
out(8)=dGdt-dSdt*P(1,1)+QG/24-Dilution*G;

%Fructose
dFdt=-P(7,1)*F/(F+P(8,1)*(1+G/P(9,1)))*X;%
out(9)=dFdt-dSdt*P(1,1)-Dilution*F;

%PO4
dPO4dt=-P(14,1)*PO4/(PO4+P(20,1))*X;
out(11)=dPO4dt+QPO4/24-Dilution*PO4;

%PO4i

```

```
dPO4idt=(-dPO4dt/C/1000-P(22,1)*dCdt/C)*C*1000/X;
out(12)=dPO4idt;
```

```
end
```

### Parametres.m

```
%Fonction qui renvoie un vecteur contenant les paramètres du modèle
function out=Parametres(Val,Indice);
```

```
out=zeros(50,1);
%*****HYDROLYSE DU SUCROSE*****
%Hydrolyse      : Sucrose --> glucose  + Fructose
%      moles    :      1          1          1
% masse(g/mol) :  342.2992    180.1572    180.1572
% masse(g)     :      1          0.52631499  0.52631499

out(1,1)=0.52631499;%Khyd constante, pas paramètre

%*****ABSORPTION*****
%Paramètres hydrolyse sucrose(step) optimisés avec cultures batch
out(2,1)=0.183;%Vs
out(3,1)=0.36;%Ks

%Paramètres absorption glucose(step+inhibition par fructose)
out(4,1)=0.014;%Vg
out(5,1)=0.0431;%Kg
out(6,1)=0.1909;%Kig

%Paramètres absorption fructose(step+inhibition par glucose)
out(7,1)=0.0111;%Vf
out(8,1)=0.0265;%Kf
out(9,1)=0.0226;%Kif

%Rendement sucres intra [=] gsuc/gDW
out(10,1)=2.7;%Ysuc

%Paramètres absorption NO3(step)
out(11,1)=0.0007;%ano3
out(12,1)=0.004;%6.81%vno3
out(13,1)=0.1;%kno3

%Paramètres absorption NH4(monod)
out(15,1)=0.0025;%anh4
out(16,1)=0.006;%Vnh4
out(17,1)=0.1;%knh4

%rendements Azote
out(18,1)=1/0.75;%Ynx
out(19,1)=1/(0.47*10^9);%Ync

%Paramètres absorption PO4(step)
out(14,1)=1.8;%Vpo4
out(20,1)=0.33;%Kpo4

%rendements po4e
out(21,1)=1/4.8;%Ypo4x
out(22,1)=1/(4.2*10^9);%Ypo4c

%*****FIN ABSORPTION*****
%*****Taux de croissance*****
out(23,1)= 0.0095;%muxmax
out(24,1)=0.013;%mucmax
```

```

%*****mux*****
%Paramètres croissance biomasse (Monod)
out(25,1)=3.8;%Kchomux
out(26,1)=0.001;%Knmux
out(27,1)=0.001;%Knp4mux

%Paramètres croissance biomasse inhibition
out(30,1)=435;%Ki1NH4mux
out(31,1)=2.6;%Ki2NH4mux

%*****muc*****
%Paramètres croissance (Monod)
out(34,1)=6;%Kchomuc
out(35,1)=0.001;%Knmuc
out(36,1)=0.001;%Knp4muc

%Paramètres croissance inhibition
out(39,1)=1000;%Ki1NH4muc
out(40,1)=3;%Ki2NH4muc

```

### **Erreur.m**

```

function [ek,epv2]=erreur(T,Y,B,no,t,VarMesure,NoCulture)

global CPE
global ERM
ValeurMinPermise=[0.1 0.1];
eknum=0;
ekden=0;
ev2=0;
epv2=0;

Nech=size(t);
%Boucle pour chaque variable dont l'erreur est considérée
for Var=1:size(VarMesure,2)
    EchUsed=0;
    VarTotale=0;

    %Calcul la moyenne de la variable mesurée (enlève les données éronées)
    CLEANED=isnan(VarMesure(1:size(t,2),Var));
    moy=0;
    TempC=0;
    for Temp=2:size(t,2)
        if CLEANED(Temp)==0
            moy=moy+VarMesure(Temp,Var);
            TempC=TempC+1;
        end
    end
    moyenne=moy/TempC;

    %Boucle pour chaque échantillon
    for ech=2:size(t,2)

        if VarMesure(ech,Var)>=ValeurMinPermise(Var)

            %erreur relative moyenne
            eknum=eknum+abs(intrapol(t(ech),T,Y(:,Var))-VarMesure(ech,Var));
            ekden=ekden+VarMesure(ech,Var);

            %Carré pondéré
            ev2=ev2+(intrapol(t(ech),T,real(Y(:,Var)))-VarMesure(ech,Var))^2;

            VarTotale=VarMesure(ech,Var)+VarTotale;
            EchUsed=EchUsed+1;
        end
    end
end

```

```

        end

        end
        if EchUsed==0
            epv2=0;
        else
            VarMoyenne=VarTotale/EchUsed;
            epv2=ev2/Nech(2)/VarMoyenne^2+epv2;
        end

    end
    CPE(NoCulture)=epv2;

if EchUsed>0
    ERM(NoCulture)=eknum/ekden*100;
    ek=eknum/ekden*100;
else
    ERM(NoCulture)=0;
    ek=0;
end

end

```

### **LoadXL.m**

```

function out=LoadXL(culture,data);
%*****
%LoadXL(culture,data)
%Retourne un vecteur contenant le paramètre de culture "data"
%de la culture sous la forme du vecteur [temps data]
% culture : Nom du fichier XLS de la culture (sans l'extension .xls)
% data : Nom du paramètre ex. 'NO3'
%Les fichiers XLS contenant les données doivent respecter un ordre pré-établie
%Chaque colonne du tableur doit correspondre à celle identifiée plus bas %(Voir
commentaire FORMAT DES COLONNES plus bas
%*****

%Charge les données du fichier XLS
[A B]= XLSREAD(strcat(culture,'.xls'));

%Filtre les donnees enlève les donnees non-numeriques
%enleve ligne des titres
if isnan(A(1,1))
    A(1,:)=[];
end
s=size(A);

%scan toutes les valeurs du fichier remplace les données non valides (pas des
%chiffres)
for i=1:s(2)

    for j=1:s(1)
        %si pas un chiffre et pas la colonne des echantillons(NaN conservé
        %pour detecter ajouts)
        if and(isnan(A(j,i)),i~=4);
            %si donnée suivante pas un chiffre
            if isnan(A(j+1,i));
                %moyenne avec donnee +2
                A(j,i)=(A(j+2,i)+A(j-1,i))/2;
            else
                if j==1
                    A(j,i)=0;
                else
                    A(j,i)=(A(j+1,i)+A(j-1,i))/2;
                end
            end
        end
    end
end

```

```

        end
    end
end

%FORMAT DES COLONNES:les prochaines lignes attribuent la colonne du fichier %XLS
correspondant à la variable « data ». Par exemple, la biomasse sèche %est
appelée comme ceci : loadXL('Nom de la culture','DW')
%La valeur attribuée a la variable Y est le numéro de la colonne où doivent
%être placés les données d'échantillonnage dans le fichier XLS (DW->colonne %6,
DATE->Colonne 1 etc.)

if strcmp(data,'DW')
Y=6;
elseif strcmp(data,'DATE')
Y=1;
elseif strcmp(data,'t') %Temps en heure
Y=2;
elseif strcmp(data,'pH')
Y=3;
elseif strcmp(data,'no') %numéro de l'échantillon, si ajout ponctuel la cellule du
fichier XLS contient le text 'add'
Y=4;
elseif strcmp(data,'WW')
Y=5;
elseif strcmp(data,'W/D')
Y=7;
elseif strcmp(data,'NdeC')
Y=8;
elseif strcmp(data,'DENSITÉ')
Y=9;
elseif strcmp(data,'Cl')
Y=10;
elseif strcmp(data,'NO2')
Y=11;
elseif strcmp(data,'NO3')
Y=12;
elseif strcmp(data,'PO4')
Y=13;
elseif strcmp(data,'SO4')
Y=14;
elseif strcmp(data,'Na')
Y=15;
elseif strcmp(data,'NH4')
Y=16;
elseif strcmp(data,'K')
Y=17;
elseif strcmp(data,'Mg')
Y=18;
elseif strcmp(data,'Mn')
Y=19;
elseif strcmp(data,'Ca')
Y=20;
elseif strcmp(data,'Glucosimetre')
Y=21;
elseif strcmp(data,'SUC')
Y=22;
elseif strcmp(data,'GLUC')
Y=23;
elseif strcmp(data,'FRUC')
Y=24;
elseif strcmp(data,'PNH4')
Y=25;
elseif strcmp(data,'PNO3')
Y=26;

```

```

elseif strcmp(data,'Pg')
Y=27;
elseif strcmp(data,'PPO4')
Y=28;
%elseif strcmp(data,'AJOUTS')

end

out=A(:,Y);

```

### **PosAjouts.m**

```

function out=PosAjouts(t,no):
out=zeros(1,11);
Nbrech=size(no);
temp(1)=1;
j=2;
for i=1:Nbrech(2)
    if isnan(no(i))
        temp(j)=i;
        j=j+1;
    end
end
temp(j)=Nbrech(2);
out=temp;

```

### **Mu.m**

```

function [MUx, MUC]=mu(T,DW,C)

for i=1:size(T,2)

    if i==1
        MUx(i)=log(DW(i+1)/DW(i))/(T(i+1)-T(i));
        MUC(i)=log(C(i+1)/C(i))/(T(i+1)-T(i));
    elseif i==size(T,2)
        MUx(i)=log(DW(i)/DW(i-1))/(T(i)-T(i-1));
        MUC(i)=log(C(i)/C(i-1))/(T(i)-T(i-1));
    else
        MUx(i)=(log(DW(i+1)/DW(i))/(T(i+1)-T(i))+log(DW(i)/DW(i-1))/(T(i)-T(i-1))+log(DW(i+1)/DW(i-1))/(T(i+1)-T(i-1)))/3;
        MUC(i)=(log(C(i+1)/C(i))/(T(i+1)-T(i))+log(C(i)/C(i-1))/(T(i)-T(i-1))+log(C(i+1)/C(i-1))/(T(i+1)-T(i-1)))/3;
    end

end

MUx=MUx;
MUC=MUC;
end

```

### **Intrapol.m**

```

function out=intrapol(t,tvect,valvect)
i=1;
ok=0;

Nbrtemps=size(tvect);
Nbrtemps=Nbrtemps(1);

while ok~=1
    if i==Nbrtemps
        out=valvect(i);
        ok=1;
    end
    i=i+1;
end

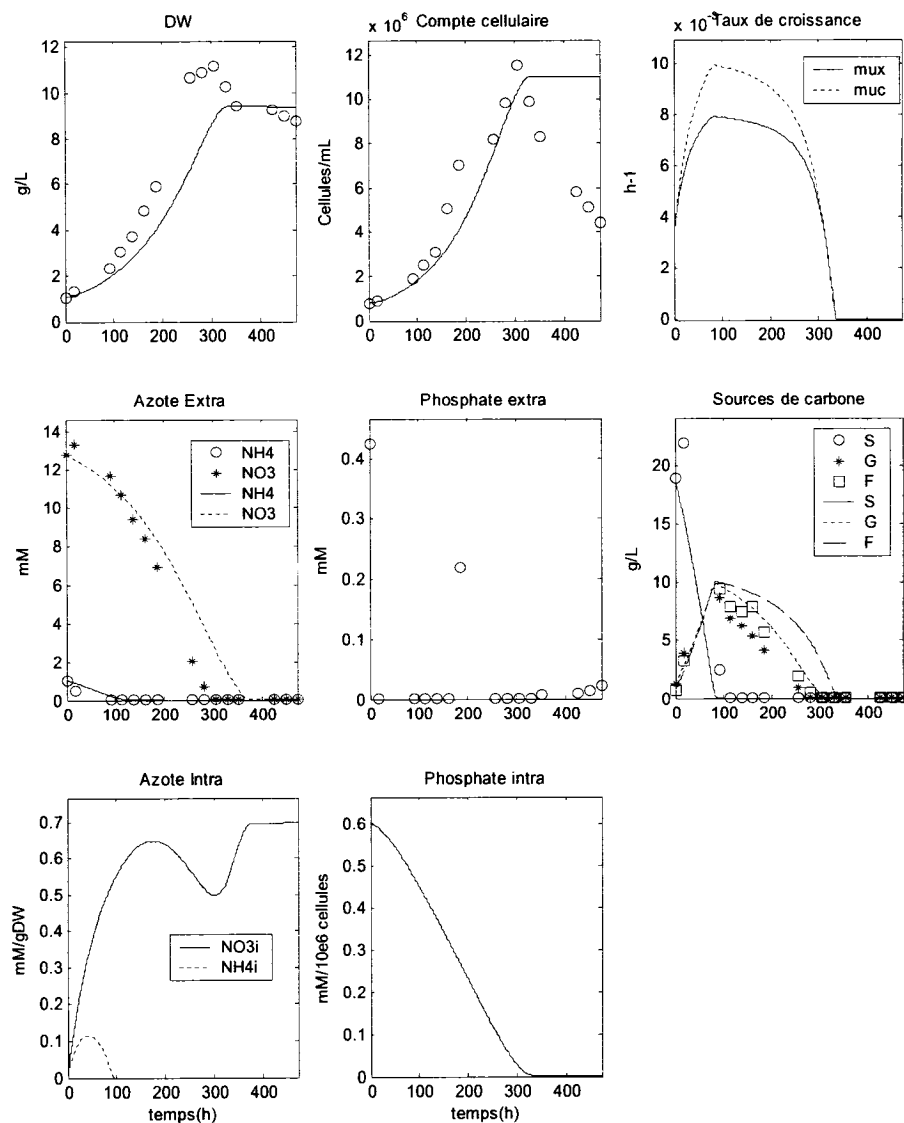
```



```
elseif tvect(i)>=t
    out=(valvect(i)-valvect(i-1))/(tvect(i)-tvect(i-1))*(t-tvect(i-
        1))+valvect(i-1);
    ok=1;
end
i=i+1;
end
```

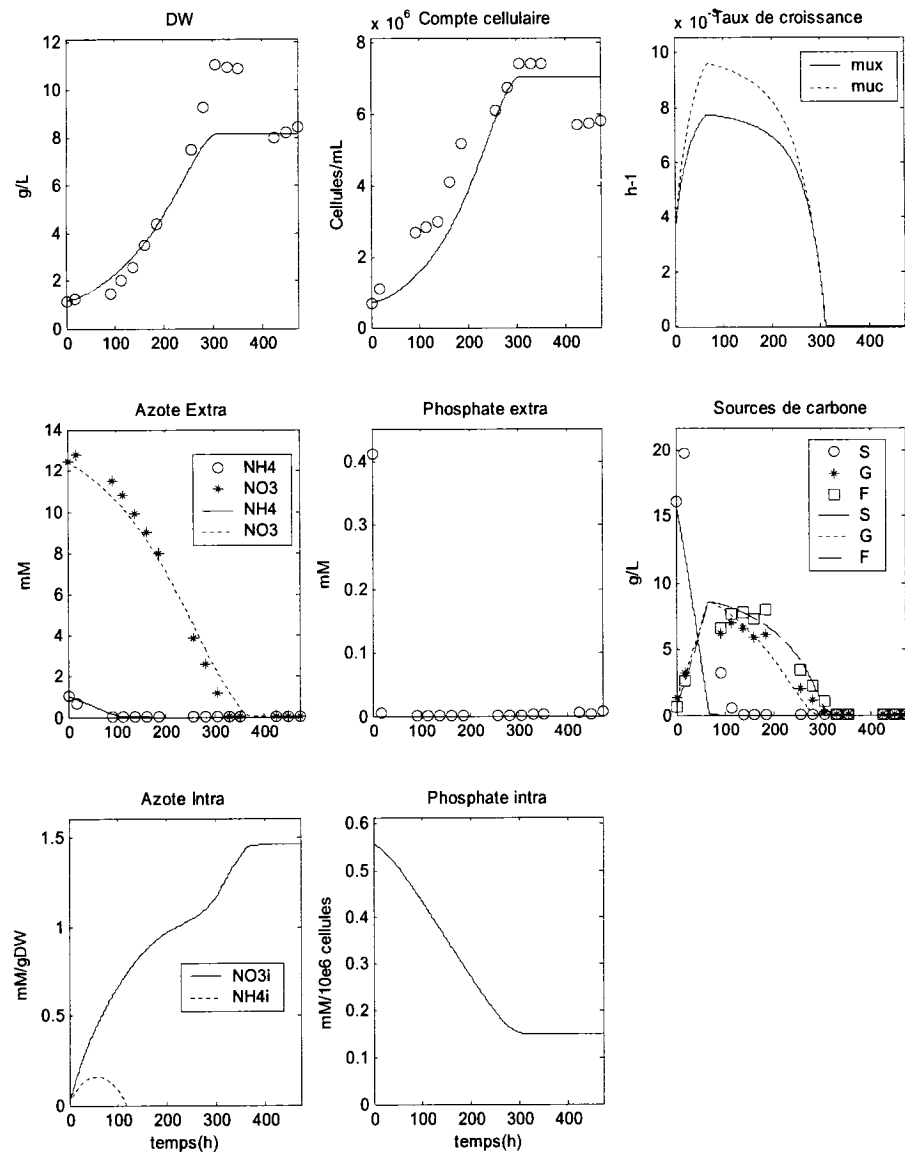
# **Annexe G: Simulations complètes des cultures utilisées pour la détermination des paramètres – Flacons de 1 L**

C1



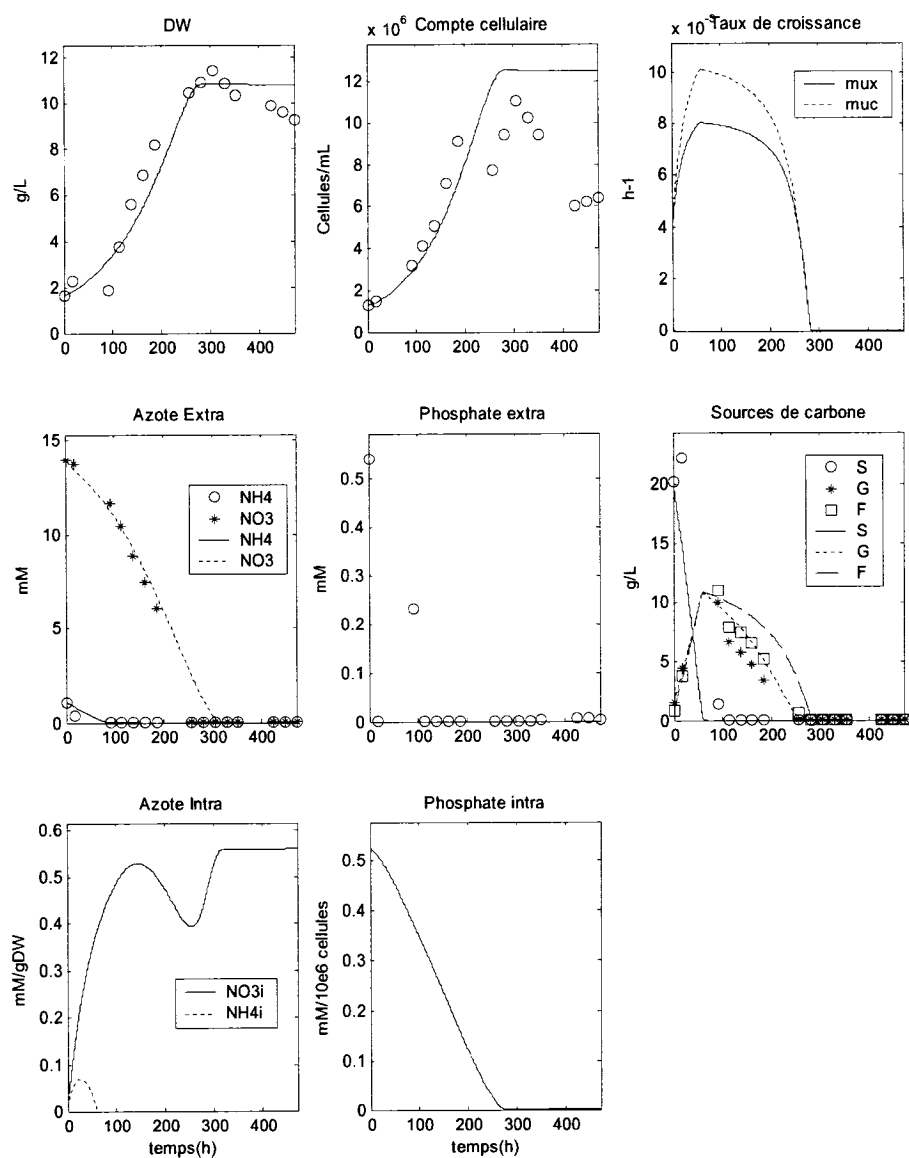
**Figure 0.1:** Simulation de la culture C1.

## C2



**Figure 0.2:** Simulation de la culture C2.

## C3



**Figure 0.3:** Simulation de la culture C3.

## C4

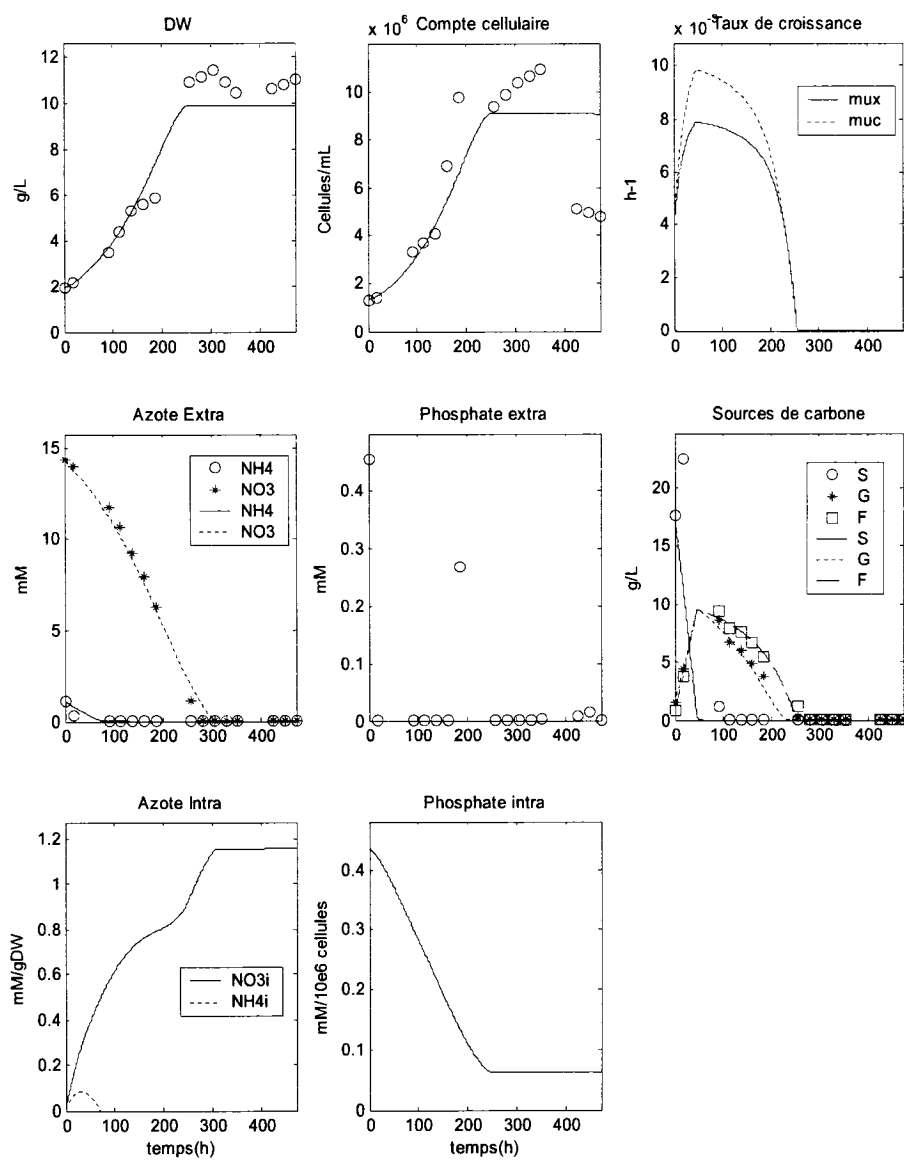


Figure 0.4: Simulation de la culture C4.

## C5

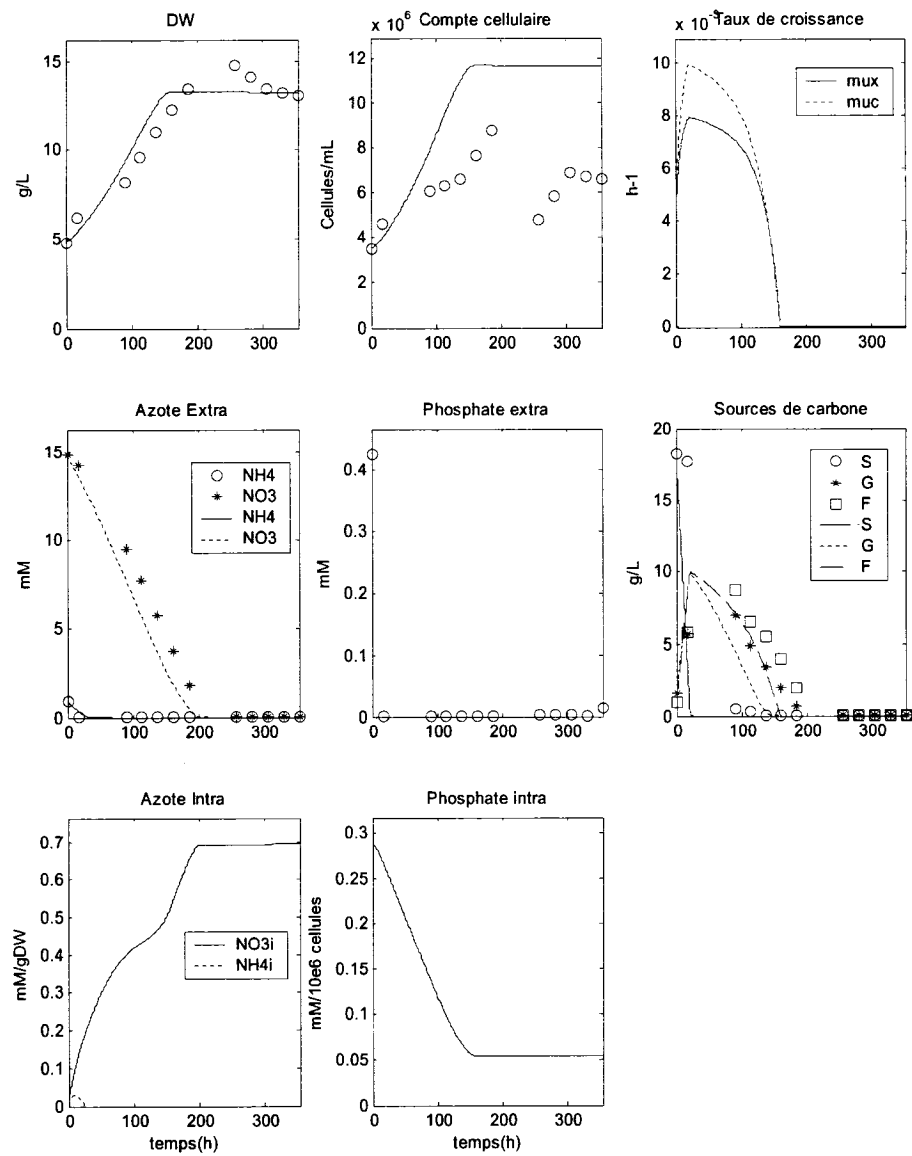


Figure 0.5: Simulation de la culture C5.

## C6

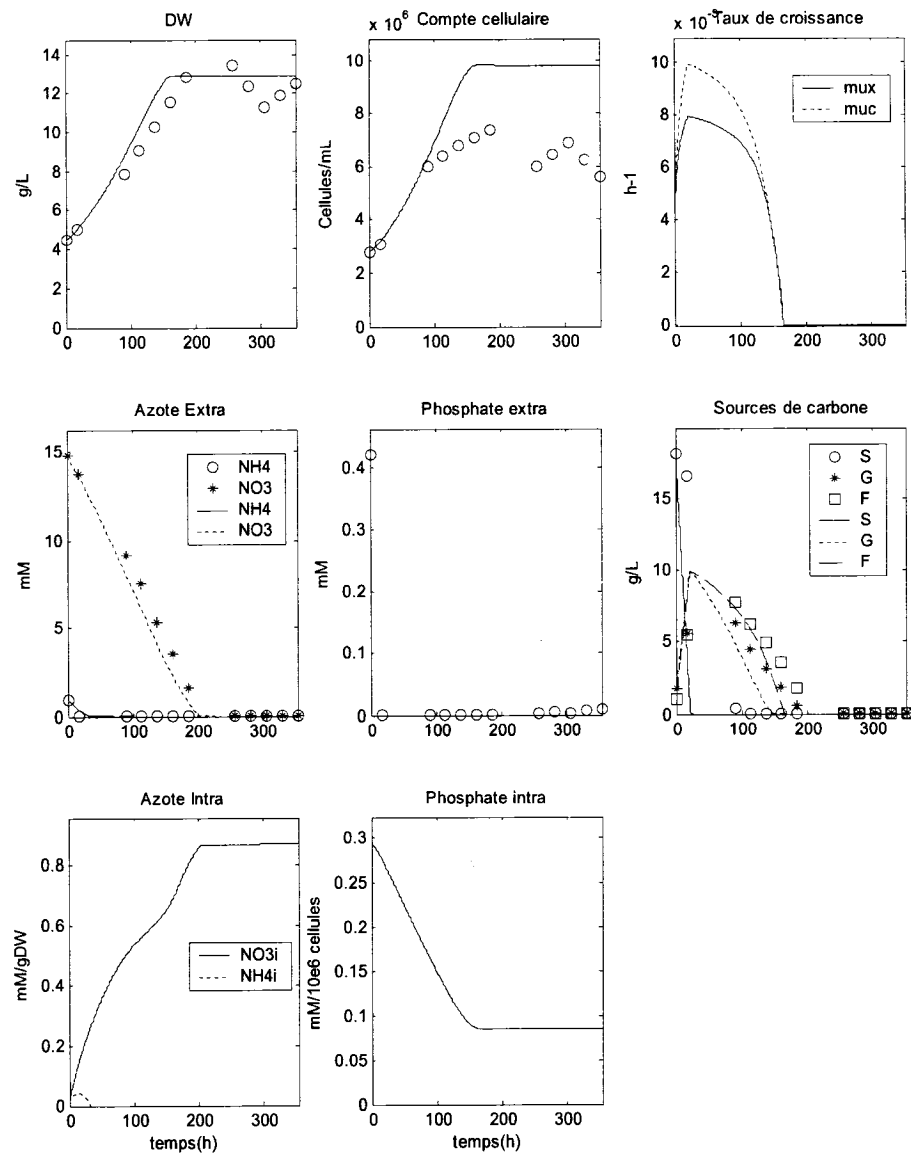


Figure 0.6: Simulation de la culture C6.

## C7

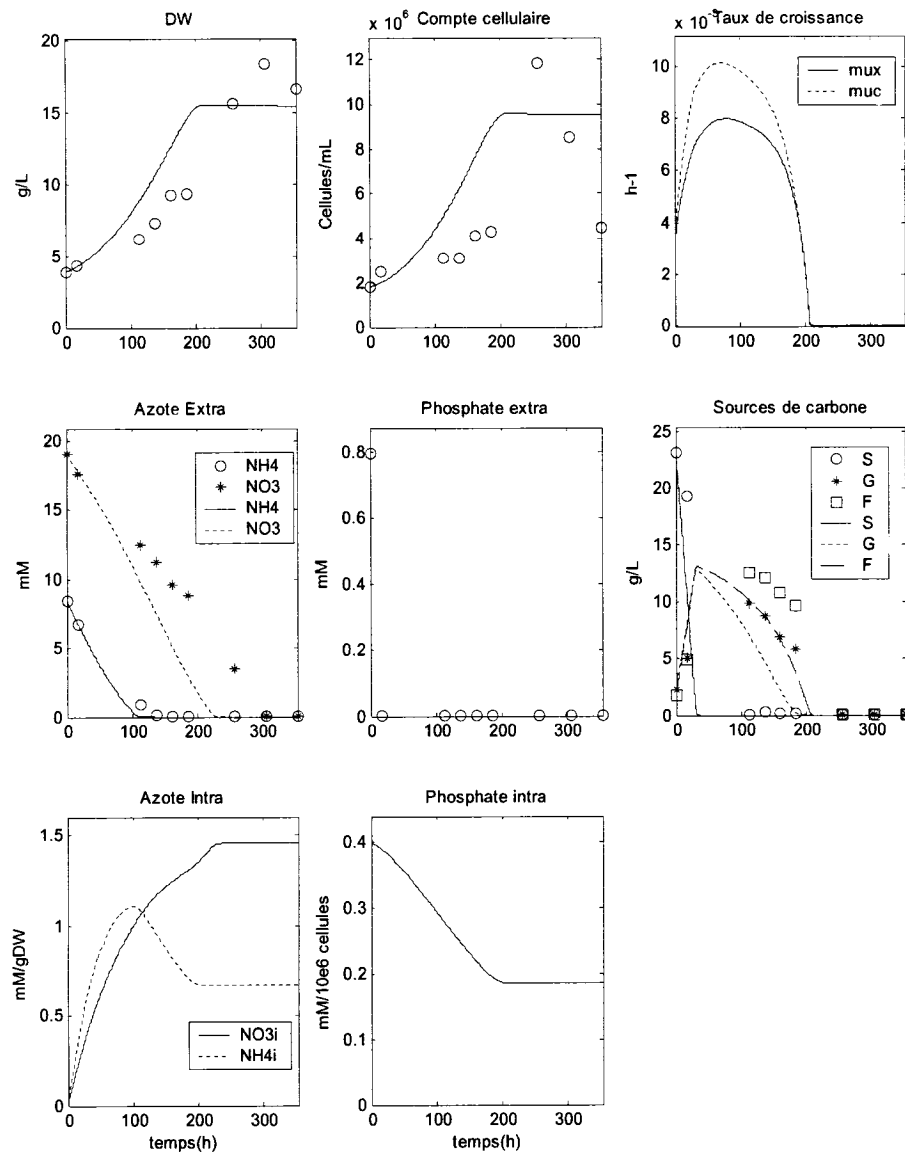


Figure 0.7: Simulation de la culture C7.



## C8

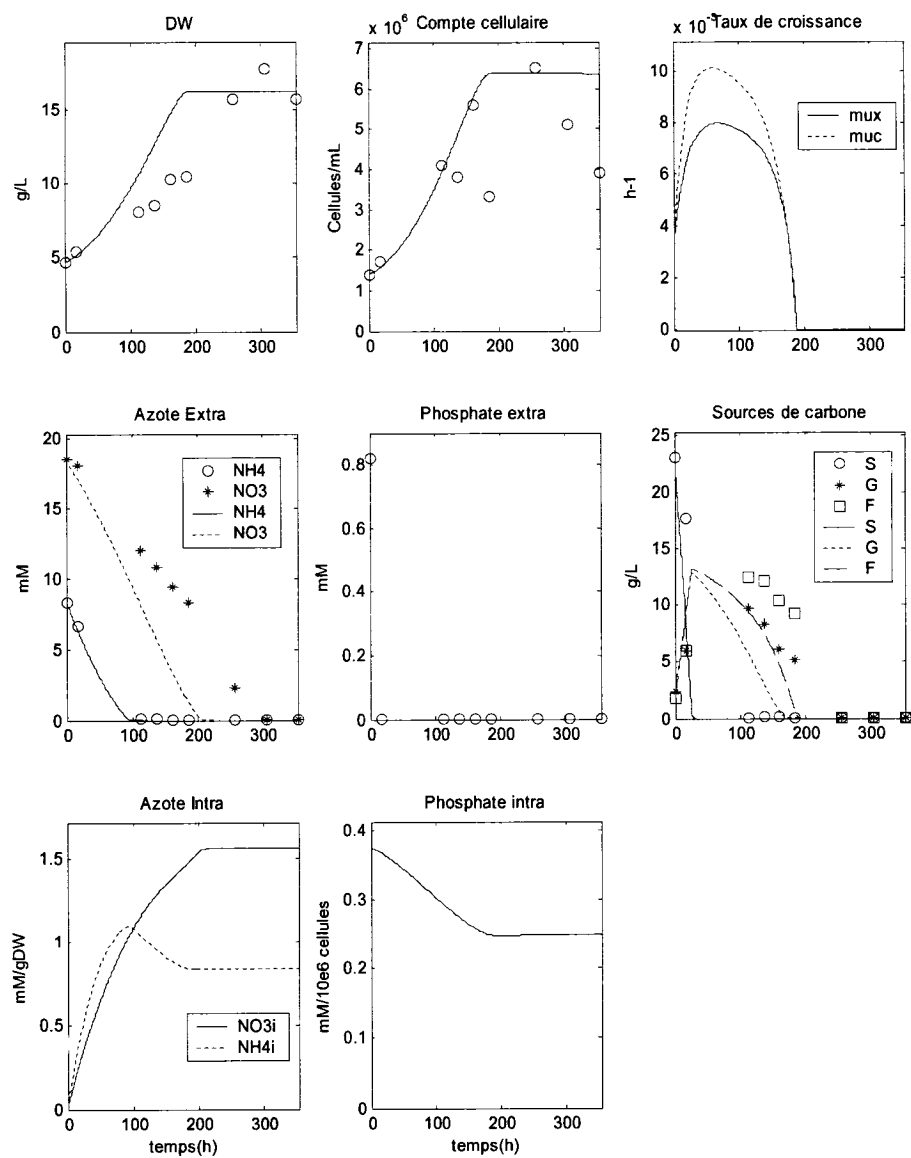


Figure 0.8: Simulation de la culture C8

## C9

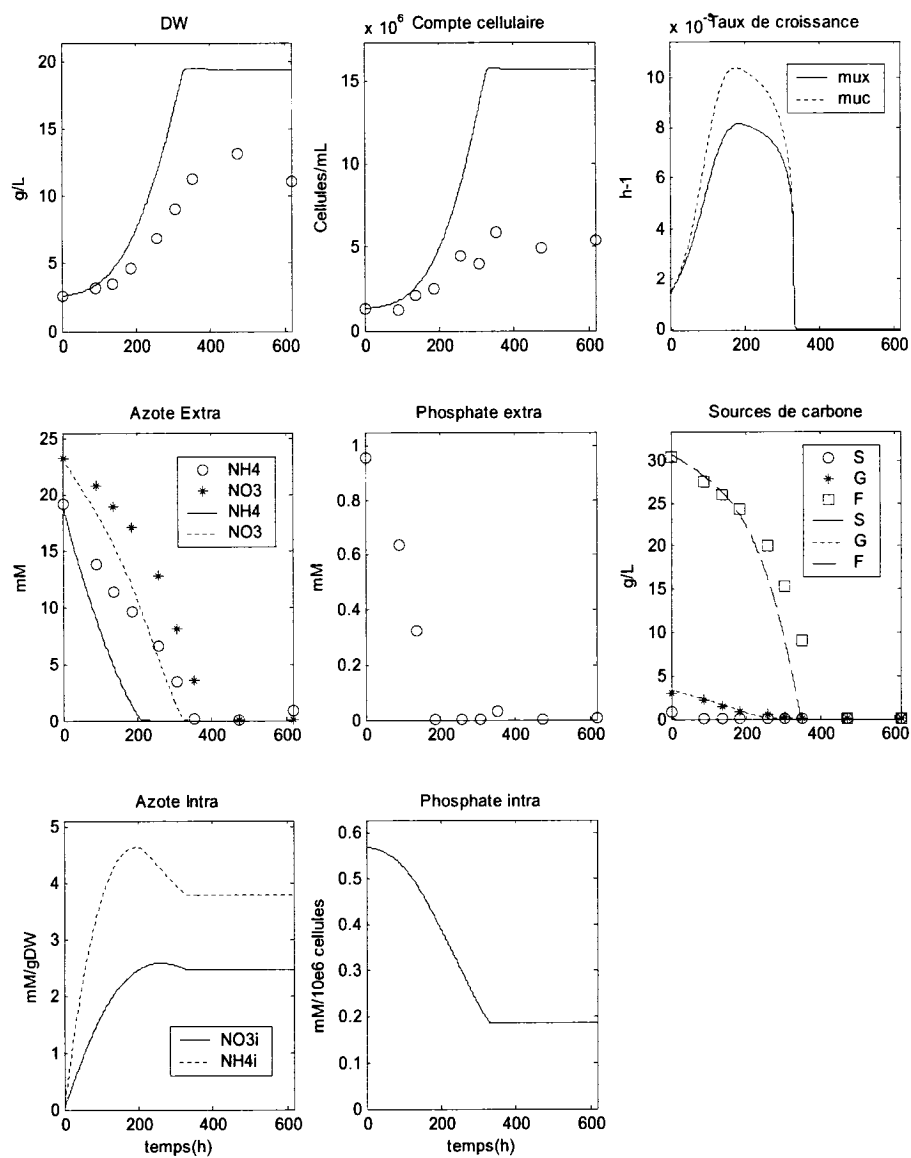


Figure 0.9: Simulation de la culture C9

## C10

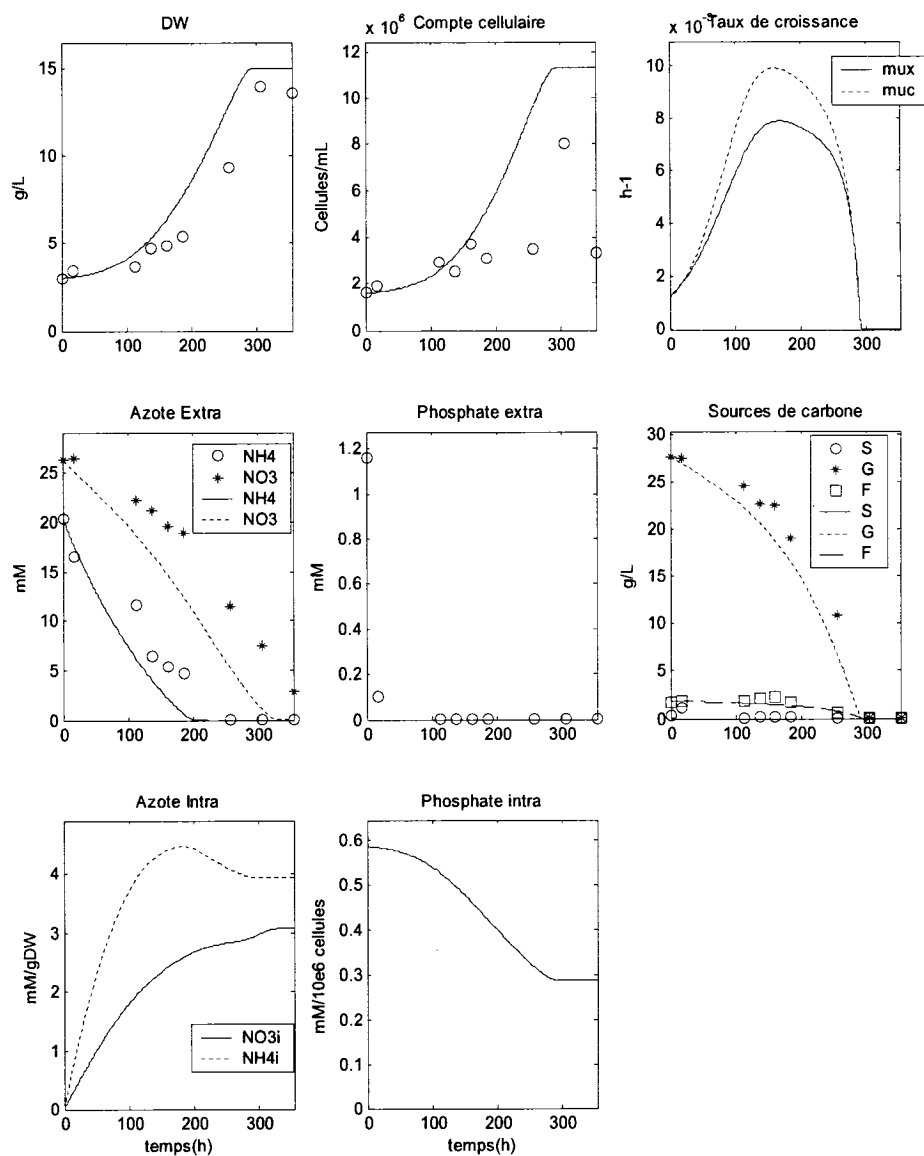


Figure 0.10: Simulation de la culture C10

## Annexe H: Simulations complètes des cultures utilisées pour la validation du modèle – Réacteurs de 4L.

C1

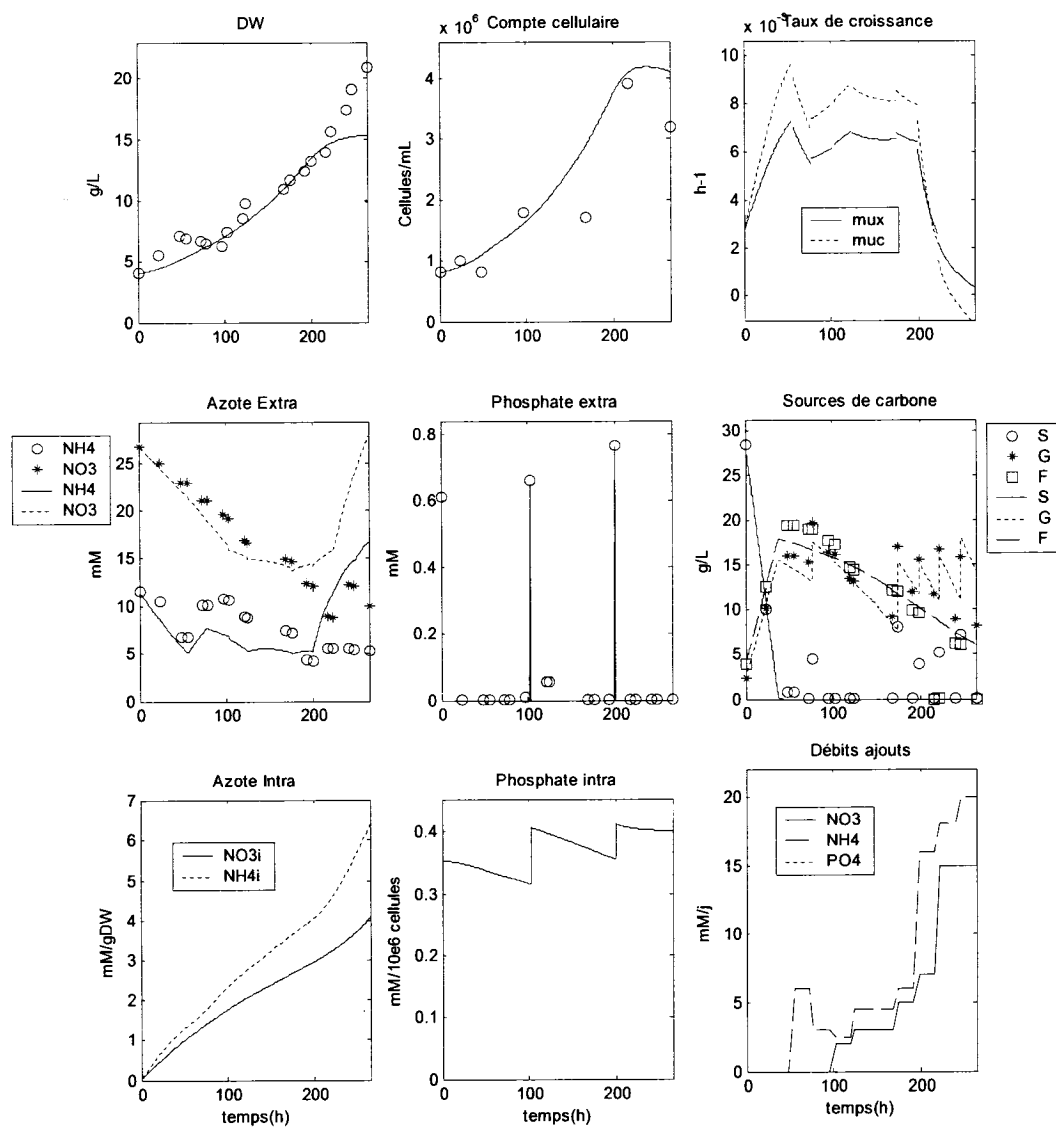


Figure 0.1: Simulation de la culture C1

## C2

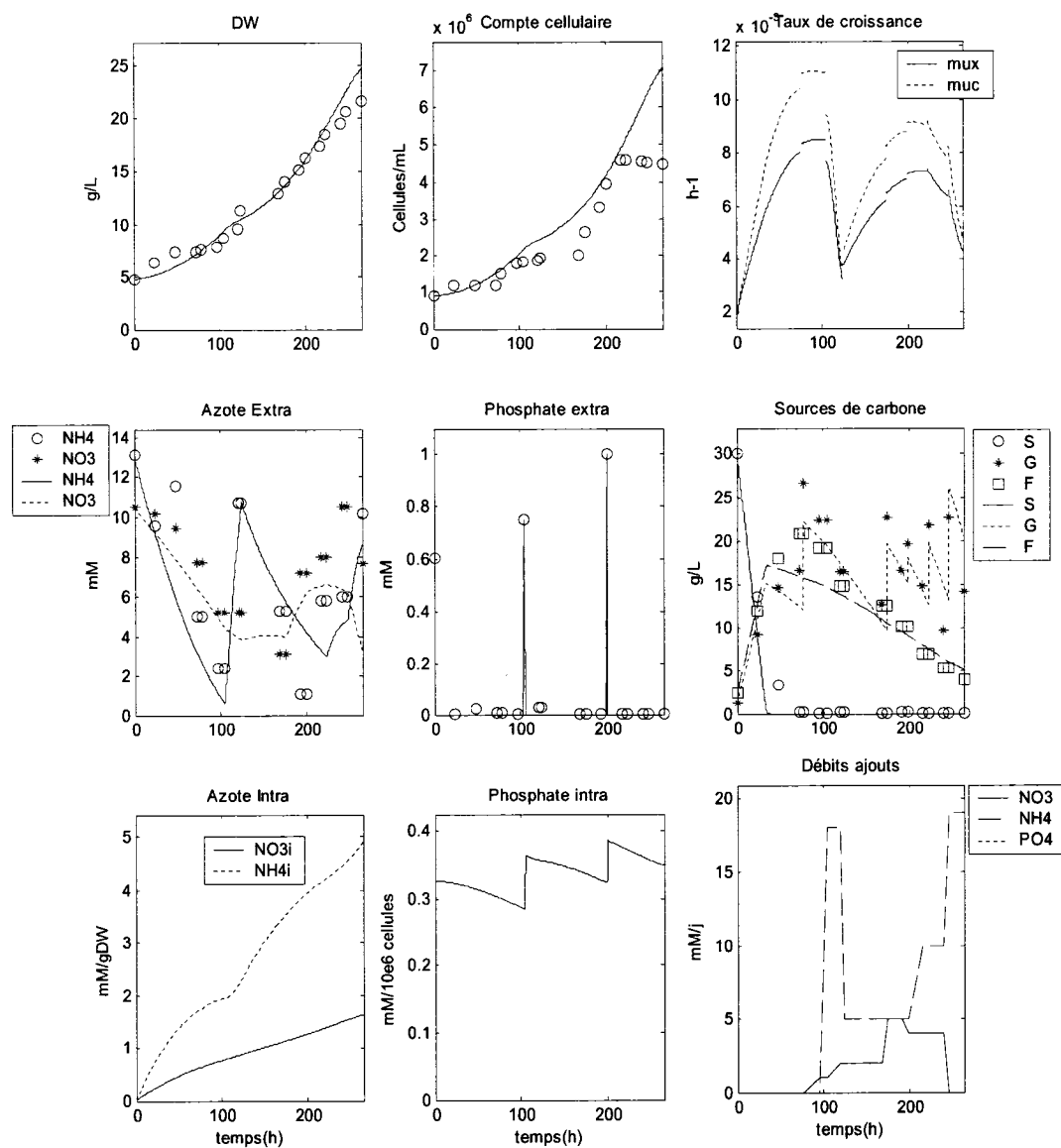
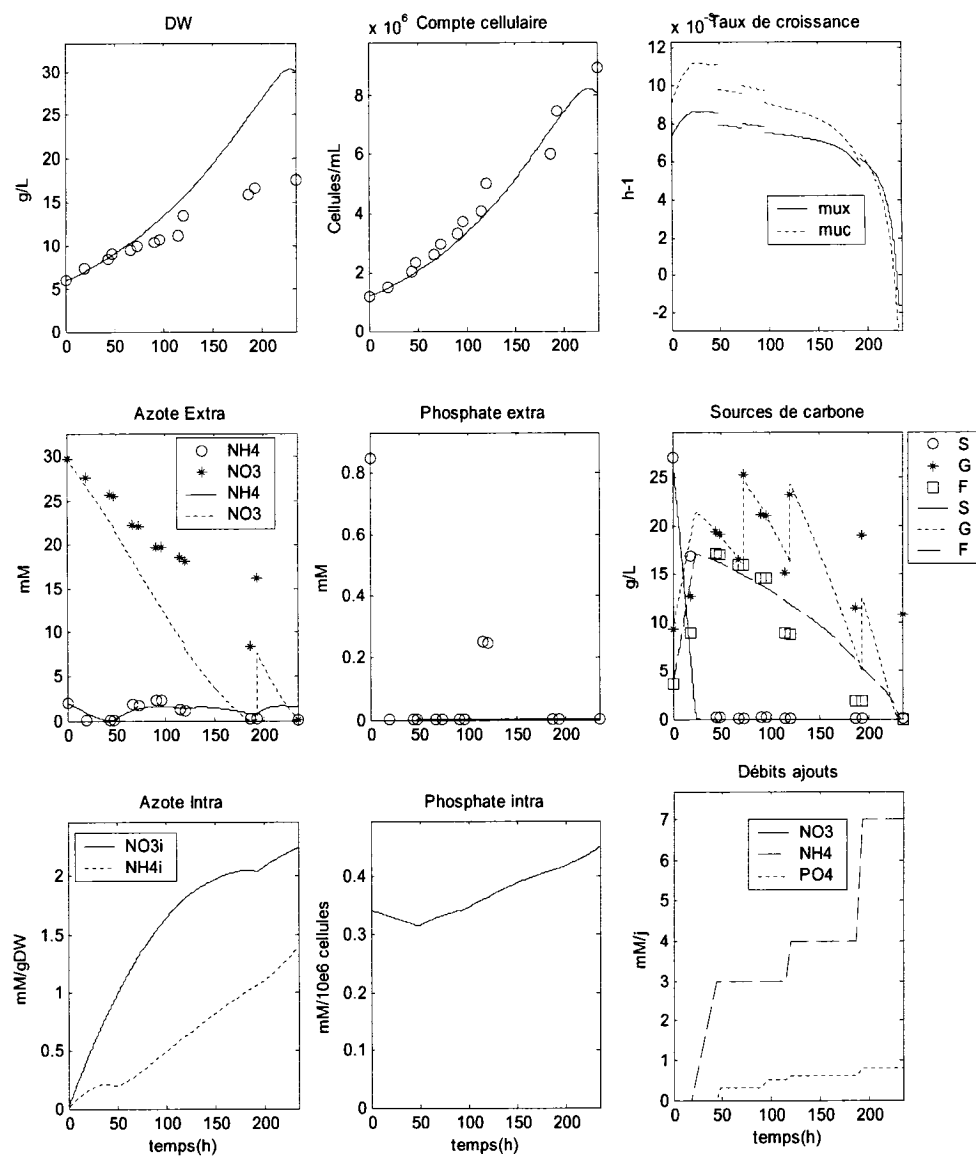


Figure 0.2: Simulation de la culture C2

## C3



**Figure 0.3:** Simulation de la culture C3

## C4

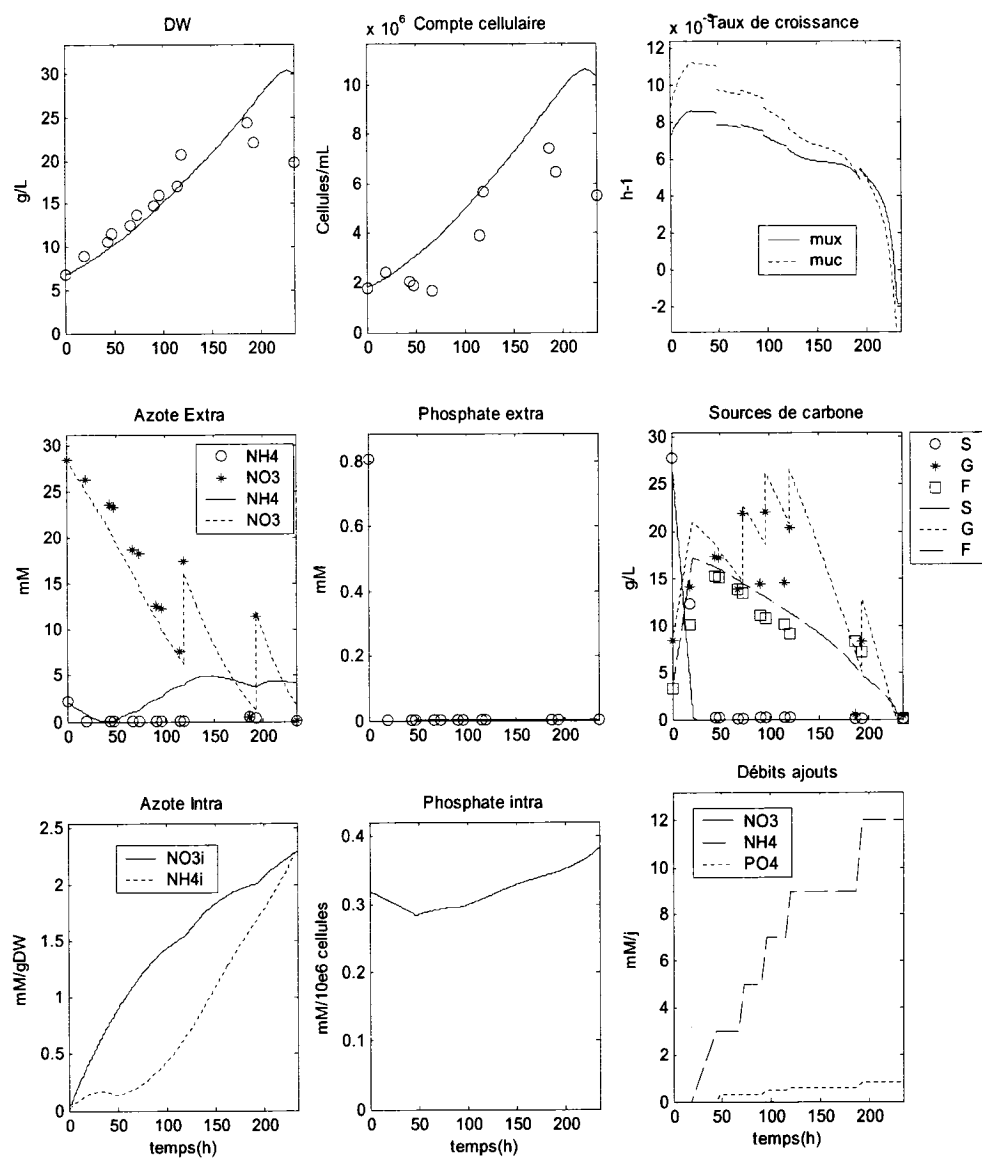


Figure 0.4: Simulation de la culture C4

## C5

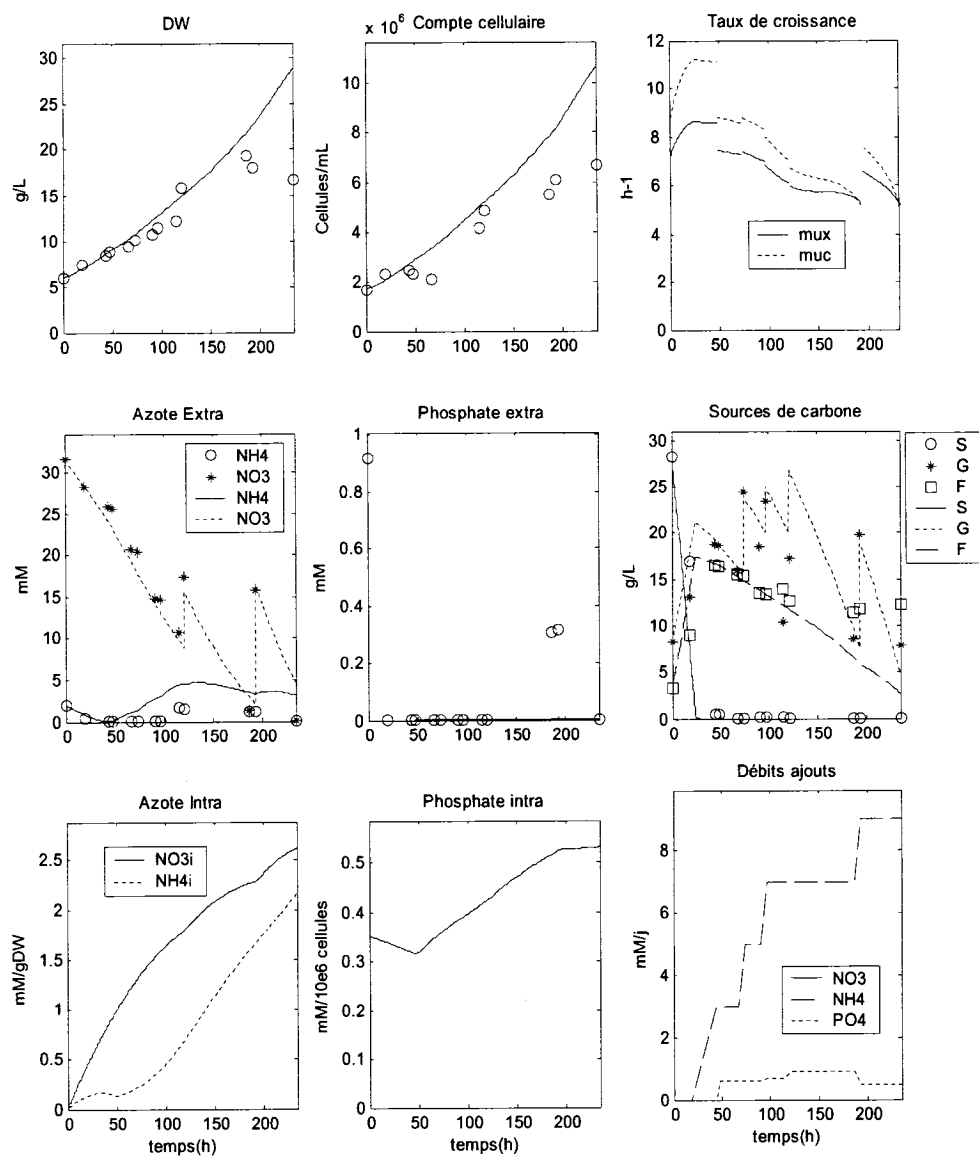


Figure 0.5: Simulation de la culture C5